

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-008027

(43)Date of publication of application : 15.01.2004

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A61K 38/00
A61P 3/04
A61P 7/10
A61P 9/10
A61P 9/12
A61P 19/10
A61P 25/04
A61P 35/00
A61P 43/00
C07K 14/47

(21)Application number : 2002-162797 (71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP
NATIONAL CARDIOVASCULAR
CENTER
(22)Date of filing : 04.06.2002 (72)Inventor : MINAMINO NAOTO
KATABUCHI TAKESHI

(54) NEW PEPTIDE HAVING cAMP-PRODUCING ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new protein which is expressed in a central nervous system and acts on a calcitonin receptor, to provide a gene therefor, and to provide a medicinal composition containing the same.

SOLUTION: This peptide has the following properties (1) to (6). (1) The peptide is expressed in a central nervous system. (2) The peptide strongly acts on a calcitonin receptor. (3) The peptide stimulates the cAMP-producing ability of a cell. (4) The peptide has an action for taking sodium ion in concentration dependency. (5) The peptide depresses the intake of calcium ion. (6) The peptide has a cell proliferation-inhibiting action. More concretely, the peptide has a specific amino acid sequence originated from swine brain or an amino acid sequence obtained by subjecting a part of the amino acid sequence to a deleting, substituting or adding treatment. In addition, a gene encoding the peptide, and a medicinal composition containing the same.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.07.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-8027

(P2004-8027A)

(43) 公開日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 7/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/12	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-162797 (P2002-162797)	(71) 出願人	396020800
(22) 出願日	平成14年6月4日(2002.6.4)		科学技術振興事業団
			埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(71) 出願人	591108880
			国立循環器病センター総長
			大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号
		(74) 代理人	100102668
			弁理士 佐伯 憲生
		(72) 発明者	南野 直人
			大阪府寝屋川市大字高宮652-335
		(72) 発明者	片淵 剛
			大阪府茨木市豊川4-26-8-304
		Fターム(参考)	4B024 AA01 BA80 CA04 HA01 HA12
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 c AMPの産生活性を有する新規ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用な蛋白質、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

【解決手段】次の(1)～(6)の性質、(1)中枢神経系において発現し、(2)カルシトニン受容体に強く作用し、(3)細胞のcAMP産生能を促進させ、(4)ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5)カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6)細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より具体的には、ブタ脳由来の特定なアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。また、本発明は、これらのペプチドをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の (1) ~ (6) の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞の cAMP 産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド。

【請求項 2】

少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

S e r - C y s - A s n - T h r - A l a - T h r - C y s - M e t - T h r - H i s - 10
1 0

A r g - L e u - V a l - G l y - L e u - L e u - S e r - A r g - S e r - G l y -
2 0

S e r - M e t - V a l - A r g - S e r - A s n - L e u - L e u - P r o - T h r -
3 0

L y s - M e t - G l y - P h e - L y s - V a l - P h e - G l y - N H ₂
3 8

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

20

ペプチドが少なくとも配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 16、若しくは配列番号 19 で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項 1 又は 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

哺乳動物由来のペプチドである請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 6】

遺伝子が、配列表の配列番号 3、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 17、又は配列番号 20 で示される塩基配列を有するものである請求項 5 に記載の遺伝子。 30

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のペプチド、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項 8】

医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、又は鎮痛剤である請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

医薬組成物が、降圧剤、又は P T C A (経皮的冠動脈形成術) 後の再狭窄を防ぐための薬剤である請求項 7 に記載の医薬組成物。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規かつ有用なペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、次の (1) ~ (10) の性質、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞の cAMP 産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【0002】

50

【従来の技術】

既知ペプチドであるカルシトニン¹⁰は、32個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。哺乳動物では甲状腺のC細胞から分泌され、血液カルシウムを低下させる作用を有する。高カルシウム血症や代謝性骨疾患などの治療薬として利用されている。カルシトニンは、甲状腺など末梢系に存在するとされていて中枢神経系には発現していないとされていた。しかし、カルシトニン受容体は中枢神経系にも存在し、中枢神経系におけるカルシトニン受容体の存在意義や作用についての解明が求められていた。

また、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)はアミノ酸37個からなる蛋白質であり、カルシトニンと同じ遺伝子から転写されたmRNAが、カルシトニンとは異なるスプライシングを受けて生成されるものである。カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、カルシトニンと同様な血液カルシウム濃度を低下させる作用も有するが、カリウムイオンチャンネルの活性化作用やアセチルコリン受容体の数を増加させる作用などもあり、神経伝達物質である可能性もあるとされている。

しかし、これらの蛋白質は中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するものであると確認されておらず、中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するペプチドの決定が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用なペプチド、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、中枢神経系からcAMP産生を指標にして新規な生理活性ペプチドを探索してきた結果、カルシトニン受容体を介して細胞に作用すると考えられる新規なペプチドを単離、精製した。この構造は、データベース(Genbank, swissprot, DDBJ)の検索結果から新規配列であることが確認された。本発明者らはこの新規なペプチドがカルシトニン受容体に作用することからカルシトニン受容体刺激ペプチド(Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide(CRSP))と命名した。

【0005】

即ち、本発明は、次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より詳細には、本発明は少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂
38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。

【0006】

また、本発明のペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)と相同性を有す

10

20

30

40

50

るペプチドを含むものであるから、CRSPの有する効果に加えてCGRPに類似した生理活性も期待できる場合がある。即ち、本発明のペプチドは、前記の(1)～(6)の性質に加えて、(7)カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8)血管の弛緩作用を有し、(9)利尿を促進させ、(10)血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似した作用を有することも期待される場合もある。

【0007】

また、本発明は前記した本発明のペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、若しくは配列番号20で示される塩基配列を有する前記した遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明のペプチド少なくとも1種、及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、鎮痛剤、降圧剤、又はPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である前記した医薬組成物に関する。

【0008】

本発明者らは、ブタ脳抽出液から腎臓上皮細胞のcAMP産生を指標にして2種の新規な生理活性ペプチドを精製した。得られたペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂
38

という38個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドをCRSPという。）と、そのC末端にさらにグリシンが結合した、

【0009】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-OH
39

という39個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドをCRSP-Glyという。）であることがわかった。

そして、これらのペプチドのアミノ酸配列をデータベース（Genbank, swiss prot, DDBJ）で検索したところ、いずれも新規なアミノ酸配列を有するものであることが確認された。

これらのアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2にそれぞれ示す。

【0010】

得られたペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより、目的の遺伝子をクローニングした。

用いたプライマーは、アミノ酸配列を基にN末端側として、

TG (C/T) AA (C/T) AC (A/C/G/T) GC (A/C/G/T) AC (A/C/G/T) TG (C/T) ATGAC、及び、

C末端側として、

CC (A/G) AA (A/C/G/T) AC (C/T) TT (A/G) AA (A/C/G/T) CCCATA

であった。

得られた遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示し、それがコードしているアミノ酸配列を以下に示す。

【0011】

```

Met-Gly-Phe-Trp-Lys-Phe-Pro-Pro-Phe-Leu-
  10
Val-Leu-Ser-Ile-Leu-Val-Leu-Tyr-Gln-Ala-
  20
Gly-Met-Phe-His-Thr-Ala-Pro-Met-Arg-Ser-
  30
Ala-Phe-Gly-Ser-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Thr-
  40
Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-
  50
Ala-Ala-Met-Val-Asn-Asp-Tyr-Glu-Gln-Met-
  60
Lys-Ala-Arg-Glu-Met-Gln-Lys-Gln-Arg-Ala-
  70
Gln-Gly-Ser-Gly-Ile-Ser-Val-Gln-Lys-Arg-
  80
Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
  90
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
 100
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
 110
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Arg-
 120
Arg-Arg-Asn-Phe-Trp-Ile
 126

```

(式中、下線を引いた81番目～118番目までがCRSPである。)

このアミノ酸配列を配列表の配列番号4に示す。

【0012】

ブタCRSPをプローブにしてウシ及びイヌ甲状腺cDNAライブラリーから本発明のペプチドを得た。

ウシのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

ACNTATCMTHRLAGWLSRSG
SMVRSNLLPTKMGFKIFNGP-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0013】

```

Ala-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
  10
Arg-Leu-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
  20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
  30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Ile-Phe-Asn-Gly-Pro-
  40
OH

```

【0014】

また、イヌのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、
 SCNSATCVAHWLGGLLSRAG
 SVANTNLLPTSMGFKVYN-OH
 である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0015】

Ser-Cys-Asn-Ser-Ala-Thr-Cys-Val-Ala-His-
 10
 Trp-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-Gly-
 20
 Ser-Val-Ala-Asn-Thr-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr- 10
 30
 Ser-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Tyr-Asn-OH
 38

【0016】

これらのアミノ酸配列、塩基配列、及び遺伝子がコードしている全アミノ酸配列をそれぞれ配列表に示す。

ウシの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

また、イヌの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号10に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号11にそれぞれ示す。

【0017】

ブタCRSPのコード領域全長をプローブとして、ブタ遺伝子ライブラリーよりCRSPと相同性を有するペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをそれぞれ、CRSP-2、CRSP-3と名付けた。

また、同様にして、ブタカルシトニン(CT)と相同性を持つペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをCT-2と名付けた。CRSP-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0018】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His-
 10
 Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
 20
 Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr-
 30
 Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH₂ 3
 7

【0019】

CRSP-3のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His-
 10
 Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
 20
 Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile-
 30
 Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH₂
 37

【0020】

CT-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

30

40

50

【表 1】

ラジオイムノアッセイで測定したCRSPの組織含量

組織	CRSPの免疫活性 (pmol/g 組織)			
大脳皮質	0.29	±	0.04	
小脳	0.18	±	0.02	
中脳	7.5	±	0.9	
海馬	0.78	±	0.16	10
尾状核	1.3	±	0.1	
視床	3.5	±	0.4	
視床下部	9.9	±	1.2	
橋・延髄	2.2	±	0.3	
脊髄	0.52	±	0.06	
嗅球	0.74	±	0.22	
下垂体前葉	14	±	2	
下垂体後葉	96	±	15	
肺	0.11	±	0.00	20
副腎	0.42	±	0.05	
腎臓・皮質	0.12	±	0.01	
腎臓・髄質	0.088	±	0.039	
肝臓	0.13	±	0.02	
脾臓	0.11	±	0.01	
胃	0.29	±	0.00	
小腸	0.072	±	0.018	
膵臓	0.066	±	0.010	
甲状腺	68	±	39	
卵巣	0.18	±	0.09	30
心房	0.20	±	0.04	
心室	0.21	±	0.09	
大動脈	0.33	±	0.19	

各数値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)を表す

【0025】

この結果、本発明のCRSPは、中枢神経系においては中脳、視床下部に、末梢において 40
は甲状腺に多くの遺伝子発現がみられた。また橋・延髄にも中程度の発現が見られ、大脳
、下垂体においても僅かではあるが発現が観察される。一方組織含量は下垂体後葉、甲状
腺が最も多く、中脳、視床下部、下垂体前葉にも高い組織含量が観察された。

【0026】

次に、CRSPの生理活性について検討した。

まず、LLC-PK₁細胞を用いてCRSPのcAMP産生活性を検討した。LLC-PK₁細胞の培地にDMEMに溶解したCRSPを添加して、分泌されてきたcAMPの量
をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。結果を図4に示
す。図4の縦軸はcAMPの産生量 (pmol/10⁵細胞/30分)を示し、横軸は各
ペプチドの濃度の逆対数 (-log (ペプチド濃度 (M)))を示す。図4の黒丸 (●) 50

は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pig CGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pig CT)をそれぞれ示す。この結果、本発明のCRSPは、ブタ腎上皮細胞由来のLLC-PK₁細胞の細胞内アデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に非常に強く(ED_{50} は約1.5 nM)上昇させる。この活性はブタカルシトニン(ED_{50} は約8.7 nM)より約6倍、ブタCGRP(ED_{50} は約62 nM)より約40倍強かった。

【0027】

次に本発明のCRSPのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの促進作用を検討した。

LLC-PK₁細胞の培養液をハンスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(^{22}Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0 M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハンスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(^{22}Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA))を終濃度CRSP 0 M+EIPA 0 M、CRSP 10^{-6} M+EIPA 0 M、CRSP 10^{-6} M+EIPA 10^{-8} M、CRSP 10^{-6} M+EIPA 10^{-7} M、CRSP 10^{-6} M+EIPA 10^{-6} M、CRSP 0 M+EIPA 10^{-6} Mとなるよう20
 う添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

結果を図5(EIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、図6(EIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、及び図7(カルシウムイオンの取り込み)にそれぞれ示す。図5、図6及び図7の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。図6の横軸のコントロールの右はCRSP単独投与の場合を示し、その右はCRSPとEIPAの共投与の各濃度を示し、右端はEIPA単独投与の場合を示す。図7中のsCTは、サケカルシトニンを示す。図5、図6、及び図7中、*印は $p < 0.05$ で、**印は $p < 0.01$ で、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。30

この結果、CRSPはLLC-PK₁細胞上のアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する。また細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制することがわかった。

【0028】

次にCRSPによる細胞増殖の抑制作用について検討した。

LLC-PK₁細胞に各濃度の各ペプチドのDMEM溶液を添加し、 ^{125}I で標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM(0.1% BSAを含む)を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。結果を図8に示す。図8の縦軸は ^{125}I -DUの取り込み量($\times 100$ cpm/ウェル)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数($-10 \log$ (ペプチド濃度(M)))を示す。図8の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン(ブタCT)を示し、白菱形(◇)はサケカルシトニン(サケCT)をそれぞれ示す。40

また、細胞の増殖数は、10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞に各濃度のCRSPのDMEM溶液を添加し、培養後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。結果を図9に示す。図9の縦軸は細胞数($\times 1,000$ 細胞/ウェル)を示し、横軸は左端はコントロール(CRSP無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

これらの結果、CRSPはLLC-PK₁細胞の増殖を抑制する作用を有することがわかった。

【0029】

次に、本発明のCRSPによるカルシトニン受容体への作用を検討した。

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。同様にオポッサム腎細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム(^{22}Na)の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。結果を図10(遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞(COS-7)のCRSP刺激によるcAMP産生能の変化)、図11(ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞のcAMP産生能の変化)、及び図12(ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞のナトリウムイオンの取り込みの変化)に示す。

図10の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウエル/30分)を示し、横軸は各ペプチド(リガンド)の濃度の逆対数(-log(リガンド濃度(M)))を示す。図10の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。図11の縦軸はcAMPの産生量(fmol/ウエル/1時間)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図11の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コントロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12において、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CTRをCOS-7に発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇(ED_{50} は約0.2 nM)する。この活性はブタカルシトニン(ED_{50} は約71 nM)より約350倍強かった。CRSPのこの作用はブタのカルシトニンより約350倍も強力で、既知の生理活性ペプチドの中で最も強いものである。同様にオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇すると同時にアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する効果が観察された。

【0030】

さらに、CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化について検討した。生理食塩水に溶解した16 nmol/kgに相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与して、血漿中カルシウム濃度及び血圧を測定した。結果を図13(CRSP投与による血中カルシウム濃度の変化)及び図14(CRSP投与による血圧の変化)に示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の**印は $p < 0.01$ で有意差があったこと示す。

この結果、CRSPの投与により、一過性に血漿中カルシウム濃度が低下するが、一方血圧に対しては明確な変動を及ぼさないことがわかった。

【0031】

続いて、CRSPとCRSP-GlyのcAMP産生促進活性の違いについて検討した。ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。結果を図15に示す。

この結果、CRSPとCRSP-Glyはほぼ同等のcAMP産生活性を有することがわかった。

【0032】

また、ウシ及びイヌから単離してきた本発明のペプチド(ウシCRSP及びイヌCRSP

）について、前記したのと同様にしてLLC-PK₁細胞を用いたCRSPのcAMP産生活性を検討した。結果を図16に示す。図16の縦軸はcAMPの産生量（pmol/ウェル/10分）を示し、横軸は添加したCRSPの濃度を示す。

この結果、ウシやイヌのCRSPでもブタCRSPの場合とほぼ同様な結果が得られることがわかった。

【0033】

本発明のペプチドの各種、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量をRT-PCRによる高感度定量により測定した。その結果を図24に示す。

CRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった。CT-2は図24に示された組織以外に局限して発現しているものと考えられる。

【0034】

以上のように、本発明のペプチドは、カルシトニンより強くカルシトニン受容体を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示された。このことは、本発明のペプチドがカルシトニン受容体の真の内因性のリガンドであることを示している。

従って、本発明のペプチドは、末梢の組織のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンはその受容体であるカルシトニン受容体を介して骨へのカルシウムの取り込みを促進させる。本発明のペプチドはカルシトニンと同様にカルシトニン受容体に作用して骨へのカルシウムの取り込みを促進させると考えられる。実際に図13で示したようにラットにおいてこのペプチドの投与により、血漿中のカルシウム濃度の減少が観察された。この結果は骨へのカルシウムの取り込みの促進を裏付けていると考えられる。この作用を利用して骨粗鬆症により低下した骨密度を健常状態に回復させるための薬剤として利用が可能であり、骨粗鬆症の予防・治療剤として使用することができる。

また図13に示されるように、本ペプチドは、血漿中のカルシウム濃度を低下させる活性を持っており、アルカローシス等に伴う高カルシウム血症の血漿中カルシウム濃度を通常レベルにまで下げるための薬剤への応用が可能であり、高カルシウム血症の治療・予防剤として使用することができる。

本ペプチドは、腎上皮細胞のアミロライド感受性Na/H共輸送体の作用を活性化する。これはカリウム保持性の利尿剤であるアミロライドの反対方向の活性であり、抗利尿剤として使用できる。

本発明のペプチドは、図8及び図9で示したようにカルシトニン受容体を介して腎上皮細胞の増殖を強く抑制する。カルシトニンはカルシトニン受容体を介して腺ガン細胞等の増殖を強く抑制する事が報告されている（Cancer Res. 1985, 45, 4890-4894他）ため、同様に本発明のペプチドもカルシトニン受容体を介してこれらのガン細胞の増殖をカルシトニンよりも強力に抑制すると考えられ、ガンの治療、予防薬として使用できる。

【0035】

本発明のペプチドは、中枢に大量に発現していることが示された。従来から知られてきたアゴニストであるカルシトニンは中枢における発現が認められず、一方カルシトニン受容体は中枢に発現しているため、この事は本発明のペプチドが中枢における真の内因性リガンドであることを示している。カルシトニンを脳室内に投与すると、食欲の抑制、鎮痛作用を示すことが報告されている。カルシトニンは脳内に発現していないため、本ペプチドが脳内でこれらの作用を担っているものと考えられる。

したがって、本発明のペプチドは、中枢神経系のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンは中枢神経系で食欲の抑制に働いていることが報告されている（Science 1979, 206, 850-852、THE BONE 1992, 6, 69-74他）。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化することができる本

発明のペプチドは強い食欲抑制作用を示す可能性が高い。本発明のペプチドの投与により肥満及びそれに伴う疾患（高血圧、高脂血症等）の治療・予防薬として使用することができる。

さらに、従来よりカルシトニン製剤がガンの転移や骨粗鬆症等による骨の痛み、偏頭痛、肺炎による痛み等に対し鎮痛作用を示すことが報告されている（Am. J. Med. Sci. 1997, 313, 13-16他）。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する本発明のペプチドは、カルシトニンと同様に強い鎮痛作用を示す可能性が高く、これらの痛みに対する鎮痛剤として有効性を有する。

【0036】

本発明のペプチドは、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞のcAMP産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有することを特徴とするものである。これらの作用を有するペプチドであれば、前記したアミノ酸配列を有するものに限定されないが、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチドのアミノ酸配列と50%以上、好ましくは60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。前記した例ではブタからの本発明のペプチドであるCRSPを示してきたが、本発明のペプチドはブタ由来のものに限定されるものではなく、ヒト、ラット、イヌ、ウシなどの哺乳動物、サケなどの魚類動物などに由来するペプチドを包含している。

本発明のペプチドは、天然から抽出などの操作により、分離精製することもできる。また、通常のペプチド合成法により合成することもできる。さらに、本発明の遺伝子を適当なベクターに組み込んで、原核細胞や真核細胞を宿主細胞として遺伝子組換え技術により製造することもできる。

【0037】

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドと製薬上許容される担体からなるものである。

本発明の医薬組成物は、経口投与又は経口投与することができ、好ましくは静脈投与、筋肉投与などの経口投与される。

本発明の医薬組成物は、注射用製剤、凍結乾燥製剤、直腸投与製剤などに製剤化することができる。また、貼付デバイス、軟膏、貼付剤などの外用剤として製剤化することもできる。さらに、舌下錠として製剤化することもできる。製剤化は通常のペプチド製剤の方法により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として本発明のペプチドのほかに他の有効成分を組み合わせ使用することもできる。本発明の医薬組成物の投与量としては、有効成分の本発明のペプチドの量として、通常は1日、体重あたり $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.1\text{mg}/\text{kg}\sim 500\text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができるが、患者の性状や疾患の症状に応じて適宜変更することができる。本発明のペプチドは、カルシトニンよりも強くカルシトニン受容体に作用するものであることから、従来のカルシトニン製剤と同様に疾患に適用することもできる。

【0038】

本発明のペプチドはまた、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に相同性を有するペプチドも含まれるため、上記に記載した目的で利用できるのみならず、CGRPに類似した生理活性を利用することが可能である。

CGRPの生理活性としては、CGRP受容体に強く作用し、細胞内のcAMP産生を促進させる作用が知られている。また、CGRPは血管の弛緩作用を揺すること（Regul. Pept. 1986, 15, 1-23等）、利尿を促進させること（Proc Soc Exp Biol Med 1998, 188, 316-322等）、血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞などの細胞の増殖能を変化させること（Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87, 3299-3303; Regul. Pept. 2001, 101, 169-178等）が報告されている。

【0039】

したがって、本発明のペプチドのなかのある種のもの、特にCGRPとの相同性の高いペプチドについては、(1)中枢神経系において発現し、(2)カルシトニン受容体に強く作用し、(3)細胞のcAMP産生能を促進させ、(4)ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5)カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6)細胞増殖を抑制する作用を有する、ことに加え、(7)カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8)血管の弛緩作用を有し、(9)利尿を促進させ、(10)血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似する作用も合わせ持つものであることが期待されるが、必ずしも本発明のペプチドのすべてが(7)～(10)に示される作用を有するものではない。

このようなCGRPの有する作用に基づけば、本発明のペプチドを含む医薬組成物は、前記した本発明の医薬組成物の使用法他に次の目的に使用する製剤として利用可能である。すなわち、血管の弛緩作用を直接利用した降圧剤、中枢及び末梢神経系を介した血管弛緩作用を利用した降圧剤、利尿剤、血管平滑筋の増殖の抑制を利用したPTCA(経皮的冠動脈形成術)後の再狭窄を防ぐための薬剤などとしても使用できる可能性がある。

【0040】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0041】

実施例1 (CRSPペプチドの抽出、単離)

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過(ペリコンカセットPLAC #000-05, ミリポア社)で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度66%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上清をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム(LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 l)に吸着させた。カラムを3倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー(水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1)でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂(SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28 cm)の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分(SP-I)、2Mピリジン(pH8.0)で溶出された溶出画分(SP-II)、2Mピリジン-酢酸(pH5.0)で溶出された画分(SP-III)に分画し、SP-II I強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に溶解し、ゲル濾過(Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100ml/h)で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量1kDaから5kDaに相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過(Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100ml/h)で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2kDaから4kDaに相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0042】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー(CM52、Whatman社、2.4×45cm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH6.5):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH6.5):アセトニトリル=9:1、流速35ml/h)を用いて、10mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む)に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100μlに、4

10

20

30

40

50

%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン＝4：1）を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液（50mM酢酸ナトリウム（pH6.2）、1mMEDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01%Triton X-100）に溶解し、その内100μlずつを試験管に取り分け、50μlずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100μlの1%γ-グロブリン及び500μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

10

cAMP量の上昇が観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH6.5）約0.3M）をさらに陽イオン交換HPLC（TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液：10mMギ酸アンモニウム（pH3.8）：アセトニトリル＝9：1、B液：1Mギ酸アンモニウム（pH3.8）：アセトニトリル＝9：1、流速2ml/min）でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH3.8）約0.36M）を、さらに逆相HPLC（C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速1ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分（アセトニトリル約32%）を得た。これを再び逆相HPLC（diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速0.2ml/min）にて分離し、（アセトニトリル約29%）最終的な精製標品を得た。

20

約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4099で理論上の等電点は12.81と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム（4.6×250mm、218TP54）で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

30

【0043】

実施例2（CRSPのアミノ酸配列の決定）

アミノ酸配列はエドマン法による自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。まず、5pmolの精製標品をN末端からアミノ酸シーケンサーを用いて解析し、Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Valを決定した。次に10pmolの精製標品をトリプシン分解し、逆相HPLC（C₁₈ 218TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速0.2ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行った。得られたピークをアミノ酸シーケンサーで解析し、

40

Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg、

Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg、

Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg、

Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys、

Met-Gly-Phe-Lys、

Val-Phe

の6個のシーケンスを得ることができた。これらの配列とデータベースとの比較から本ペプチドがカルシトニン遺伝子関連ペプチドと相同性を持ち、このペプチドが

50

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
 Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-
 Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-
 Lys-Val-Phe-NH₂
 という配列であると考えられた。

【0044】

一方、質量分析計により分子量を測定したところ、4130.6±0.7Daという結果が得られた。これはアミノ酸配列から予想される4042Daと約89Da異なっていたが、この差異は2個のメチオニンの酸化(16Da×2)とアミノ酸シーケンサーで判読 10
 できなかったC末端のグリシン(57Da)の存在によるものではないかと予想された。
 最終的には次の実施例3よりこれらの予想通りに、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
 Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-
 Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-
 Lys-Val-Phe-Gly-NH₂

(2番目のCysと7番目のCysの間でジスルフィド結合を形成する。)

であることが明らかになった。

得られたCRSPのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、CRSP-Glyのアミ 20
 ノ酸配列を配列番号2に示す。

【0045】

実施例3 (相補的DNA塩基配列及び前駆体アミノ酸配列)

プローブは実施例2のアミノ酸配列を基にN末端側

(TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(
 A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC)

及びC末端側

(CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/
 G/T)CCCAT)

で合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより作成した 30

。相補的DNA λファージライブラリーはブタ視床下部mRNA(3μg)よりファルマ
 シア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社のλZAP
 IIを用いて作成した。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ(約10万個の独
 立したクローンを持つ)に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB
 培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵
 庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ
 変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリ
 スー塩酸塩(pH7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナ
 トリウム(pH7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルタ 40
 ーを80℃で2時間乾燥させた。次に乾燥したフィルターをブレハイブリダイゼーション
 液(50%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.9M塩化
 ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロ
 リドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識
 したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行う。フィルターは洗
 浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、
 0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、3mMクエン酸ナトリウム(
 pH7.0)、30mM 塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65
 ℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿
 上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。 50

単離された陽性 λ ファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号3に示し、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

得られたCRSPは、ブタカルシトニン (CT) 遺伝子関連ペプチド (CGRP) と71.1%、ヒトCGRP-Iと63.2%、ヒトCGRP-IIと71.1% のアミノ酸配列上の相同性を有していた (図2参照)。

【0046】

実施例4 (発現部位)

10

遺伝子の発現量のためのRNAの調製は酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により行った。約1gのブタ組織を5mlの変性液 (4Mグアニジンチオシアン塩、25mMクエン酸ナトリウム (pH7.0)、0.1M 2-メルカプトエタノール、0.5%サルコシン酸ナトリウム) でホモジェナイズし、1/10量の2M酢酸ナトリウム、等量の水飽和フェノール、1/5量のクロロホルムを加えよく攪拌した後、遠心分離を行った。次に水層を分離してそこに等量の2-プロパノールを加えよく攪拌し-20℃で1時間静置し、再び遠心分離し、沈殿 (RNA) を回収した。このRNAのうち30 μ gをホルムアルデヒド-アガロース変性ゲル (1%アガロース、2.2Mホルムアルデヒド、20mM Mops (pH7)、8mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA) を用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを十分水洗してホルムアルデヒドを除去した後、0.05M水酸化ナトリウムに15分間、0.3Mクエン酸ナトリウム (pH7) + 3M塩化ナトリウム溶液で45分間処理した。次にゲルに含まれるRNAをキャピラリブロット法でナイロンフィルターに転写し、RNAを転写したフィルターを80℃で乾燥させた。次にフィルターをAmbion社のULTRAhybハイブリダイゼーション液に37℃2時間浸した後、CRSPを暗号化している部分 (cDNA上の346番目-488番目の間の塩基対) を³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを洗浄液で洗浄 (30mM クエン酸ナトリウム (pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、1.5mMクエン酸ナトリウム (pH7.0)、15mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1時間を2回行う) 後、X線フィルムに感光させ、RNAの定量を行った。

20

30

結果を図3に示す。

【0047】

実施例5 (発現量の測定)

各組織のペプチド含量は合成ペプチドに対して作成した抗体を利用してラジオイムノアッセイにより測定した。組織約1gを10倍量の水で煮沸し、氷冷後酢酸を1Mになるよう加え、ホモジェナイズ後、遠心分離により不溶物を除去して抽出液を作成した。この抽出液を凍結乾燥後、緩衝液 (50mMリン酸ナトリウム (pH7.4) 80mM塩化ナトリウム、25mM EDTA、0.5% Triton X-100, 0.5%牛血清アルブミン0.05%アジ化ナトリウム) に溶解し、100 μ lずつ試験管に取り分けた。これらのCRSPを含む緩衝液及び既知濃度のCRSPを溶解した緩衝液に等量の放射性標識したCRSP及び抗体を加えて攪拌し、48時間4℃で静置した後、100 μ lの γ -glubulin及び500 μ lの23%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心後、沈殿の放射活性を既知濃度のCRSPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでCRSP量を定量した。

40

結果を表1に示す。表1は段落番号24に記載したものである。

【0048】

実施例6 (LLC-PK₁細胞におけるCRSPのcAMP産生促進作用)

LLC-PK₁細胞を栄養培地 (10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で培養し、2日後、0.05%牛血清アルブミンを含むDMEMに溶解し

50

たCRSPを細胞の栄養培地と置き換えて30分間インキュベーション後、培地を回収して、分泌されてきたcAMPの量をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。

結果を図4に示す。

【0049】

実施例7 (LLC-PK₁細胞におけるCRSP存在下でのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの作用)

LLC-PK₁細胞を6ウェル培養皿上、DMEM(10%FCSを含む)中で2日間培養した。ナトリウムイオンの取り込みの測定は以下のように行った。LLC-PK₁細胞の培養液をハンスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、10⁻⁸M、10⁻⁷M、10⁻⁶Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハンスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(EIPA))を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁸M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁷M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁶M、CRSP 0M+EIPA 10⁻⁶Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

EIPAの非存在下における結果を図5に、またEIPA存在下における結果を図6にそれぞれ示す。

【0050】

カルシウムイオンの取り込みは以下のように行った。LLC-PK₁細胞は塩化カルシウム濃度を0mMに下げたハンス液(カルシウムフリーハンス液)で洗浄した。CRSPと共に塩化カルシウム(⁴⁵Ca)を細胞上のカルシウムフリーハンス液に添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる⁴⁵Caを完全に洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

結果を図7に示す。

【0051】

実施例8 (CRSPによる細胞増殖の抑制)

LLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレート上、DMEM(10%FCSを含む)中で2日間培養し、細胞をDMEMで一度洗った後、0、10⁻¹²~10⁻⁶MのCRSPを含むDMEM(10%FCSを含む)に置換し培養した。2時間後、¹²⁵Iで標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM(0.1%BSAを含む)を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。

結果を図8に示す。

同様に10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレートに播き、DMEM(10%FCSを含む)で24時間培養した。各ウェルをDMEMで一度洗った後、0M、10⁻⁸M、10⁻⁶Mの濃度のCRSPを含むDMEM(10%FCSを含む)に培地を置換し培養した。24時間後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。

結果を図9に示す。

【0052】

実施例9 (カルシトニン受容体へのCRSPの作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオ

イムノアッセイにより測定した。

結果を図10に示す。

同様にオポッサム腎細胞（OK細胞）にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム（ ^{22}Na ）の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。

結果を図11及び図12にそれぞれ示す。

【0053】

実施例10（CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化）

生理食塩水に溶解した16nmol/kgに相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット 10
頸静脈より短期間に一度に投与した。

結果を図13及び図14に示す。

【0054】

実施例11（CRSP-Glyペプチドの抽出、単離）

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過（ペリコンカセットPLAC#000-05, ミリポア社）で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度66%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム（LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 μm ）に吸着させた。カラムを3 20
倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー（水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40：60：1）でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂（SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28cm）の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分（SP-I）、2Mピリジン（pH8.0）で溶出される溶出画分（SP-II）、2Mピリジン-酢酸（pH5.0）で溶出される画分（SP-III）に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に溶解し、ゲル濾過（Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145cm、1M酢酸、流速100ml/h）で分子量に応じてフラク 30
ションに分画し、分子量1kDaから5kDaに相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過（Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145cm、1M酢酸、流速100ml/h）で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2kDaから4kDaに相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0055】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー（CM52、Whatman社、2.4×45cm、A液：10mMギ酸アンモニウム（pH6.5）：アセトニトリル=9：1、B液：1Mギ酸アンモニウム（pH6.5）：アセトニトリル=9：1、流速35ml/h）を用いて、10mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培 40
地（DMEM、0.05% 牛血清アルブミンを含む）に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100 μl に、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン=4：1）を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液（50mM酢酸ナトリウム（pH6.2）、1mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100）に溶解し、その内100 μl ずつを試験管に取り分け、50 μl ずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4 50

℃で48時間放置した。次に100 μ lの1% γ -グロブリン及び500 μ lの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

CRSP-GlyによるcAMP産生の上昇はギ酸アンモニウム(pH6.5)約0.27Mで溶出される画分に観察された。さらに陽イオン交換HPLC(TSK-gel CMM-2SW、東ソー、7.8 \times 300mm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、流速2ml/min)でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH3.8)約0.36Mで溶出)を、さらに逆相HPLC(C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6 \times 250mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分(アセトニトリル約32%で溶出)を得た。これを再び逆相HPLC(diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1 \times 150mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)にて分離し、(アセトニトリル約29%で溶出)最終的な精製標品を得た。

実際の精製行程において約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4157Daで理論上の等電点は11.41と算出された。また上述の通りVydac社のC18カラム(4.6 \times 250mm、218TP54)で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0056】

実施例12 (CRSP-GlyのcAMP産生促進作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP又は、CRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図15に示す。

【0057】

実施例13 (イヌ・ウシCRSPの遺伝子クローニング)

RNAはイヌ及びウシの甲状腺より、酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により抽出した。mRNAの精製は宝酒造Oligotex-dT30mRNA精製キットを用いて行った。相補的DNA λ ファージライブラリーはイヌ及びウシの甲状腺mRNA(3 μ g)よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社 λ ZAPIIを用いて作成した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌を λ ファージ(約30万個の独立したクローンを持つ)に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをブレイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウ

ム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃ 1時間を2回行う) 後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラックと照合し、ブラックから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定されたウシCRSPをコードするcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号7に示し、そのコードするウシCRSPの前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号8に示す。

また、ウシCRSPのアミノ酸配列を配列番号6に示す。

決定されたイヌCRSPをコードするcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号10に示し、そのコードするイヌCRSPの前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号11に示す。また、イヌCRSPのアミノ酸配列を配列番号9に示す。

【0058】

実施例14 (ウシCRSP又はイヌCRSP刺激によるcAMP産生量の定量)

LLC-PK₁細胞を栄養培地(10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM))中で培養した。2日後、細胞を0.05%牛血清アルブミンを含むDMEMで2回洗浄し、培養皿中の培地を0.5mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン(3-isobutyl-1-methylxanthine)及び0.05%牛血清アルブミンを含むDMEM(DMEM/BSA/IBMX)に置き換えて37℃で30分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を0M及び 10^{-12} ~ 10^{-6} MになるようCRSPを溶解したDMEM/BSA/IBMXに置換し、37℃で10分間インキュベーションした。インキュベーション後、培養皿中の培地を除き、そこにエタノールを加え、細胞を破碎するために培養皿を冷凍庫で一回凍結させた。次にエタノールを試験管に移し、遠心エバポレーターを用いて標品を乾固させた。乾固した標品はDMEMに溶解し、100μlずつ取り分け、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液(ジオキサン:トリエチルアミン=4:1)を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化させた。再び遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液(50mM酢酸ナトリウム(pH 6.2)、1mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100)に溶解し、その内100μlずつを試験管に取り分け、50μlの放射性標識したサクシニル化cAMP及び50μlの抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100μlの1% γ-グロブリン及び500μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

結果を図16に示す。

【0059】

実施例15 (CRSP-2及びCRSP-3/CT-2前駆体遺伝子のクローニング)

ブタ遺伝子ライブラリーはクローンテック社から購入した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの前駆体cDNA全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ遺伝子が挿入されたλファージ(約100万個の独立したクローンを持ち、その内約30万個について行った)に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したブラックをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH 7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH 7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピ

ロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、7.5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、75mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、55℃、1時間を2回行った)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンは種々の制限酵素を用いて切断し、サザンブロッティング法により解析を行って制限酵素地図を作製した後、適当な制限酵素を用いて陽性クローンを含むDNAをpBluescriptにサブクローニングした。塩基配列はサンガー法により決定した。スクリーニングの結果、25個の陽性クローンを得ることができた。制限酵素による解析及び塩基配列決定の結果、10個のクローンはCRSPの遺伝子をコードしていることが判明した(図17)。残りの15個のクローンの内、9個は別の遺伝子を(図18及び図19)、6個はさらに別の遺伝子をコードしていることが判った。9個の遺伝子はCRSPと相同性を持つ配列を有していた。この遺伝子をCRSP-2と名付けた。また別の6個の遺伝子はCRSPとCTに相同性を有する配列を持っていた。これら遺伝子をCRSP-3及びCT-2と名付けた。図17~19において下線部がエクソンを示す。

CRSP遺伝子の塩基配列を後記配列表の配列番号5に記載する。また、CRSP-2遺伝子を配列表の配列番号15に記載する。CRSP-3遺伝子とCT-2遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号23に記載する。

【0060】

CRSPやCT/CGRPの遺伝子配列を参考に推定したcDNA配列は図20~22に示す(図20:CRSP-2、図21:CRSP-3、図22:CT-2)。図20~22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシン、斜体部がシグナルペプチド、図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。また各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行ったものが図23である。

CRSP-2のcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号13に、CRSP-3のcDNAを配列番号17に、CT-2のcDNAを配列番号21に記載する。

CRSP-2、CRSP-3とCT-2の成熟体アミノ酸配列は以下であると予想される。

CRSP-2 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr	30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37
CRSP-3 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile	30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37
CT-2 : pGlu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu	10
Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe	20
Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Ile	30
Arg-Val-Ser-NH ₂	33

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に、CRSP-3を配列番号16に、CT-2を配列番号19に記載する。

【0061】

実施例16 (CRSP-2の前駆体cDNAクローニング)

cDNAライブラリーはCRSPのcDNAクローニングを行った時に作成したブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージライブラリーを用いた。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージに感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、150mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。以上の結果、13個の陽性クローンを得ることができた。その内6個は全てCRSP前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであり、また別の6個は全てCRSP-2前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであった(図20)。残りの1個はCRSP-3の3'非翻訳領域をコードする短いクローンであった。

【0062】

実施例17 (CRSP-3及びCT-2 cDNAのクローニング)

ブタ視床下部cDNA(mRNAで20ng分)を鋳型にし、プライマー

(CRSP-3:GCCCAGCTTACGTCTCCTTT及びTCAGGTAAC TGCAATGATTT、CT-2:AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTCTGATATTCCA)及び宝酒造PyrobestDNAポリメラーゼを用いて、94℃15秒-55℃15秒-72℃1分-30サイクルのPCR法を行った。増幅されたDNAはアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色されたバンドをアガロースゲルから回収した後、Stratagene社pBluescript IIにサブクローニングし、サンガー法により塩基配列を決定した。

CRSP-3のプライマーを用いて増幅されたDNAの塩基配列の解析を行った結果、CRSP-3をコードしている事が判明した(図5)。一方CT-2のプライマーを用いたPCRではDNAの増幅が観察されなかった。

【0063】

実施例18 (RT-PCRによるCRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量の高感度定量)

ブタの各組織のtotal RNA(4μg)及びoligo dTプライマー及び東洋紡Revert Ace逆転写酵素キットを用いて鋳型cDNAを作成し、そのうち1/40をRT-PCRに用いた。各遺伝子cDNAを増幅するためのPCRは東洋紡rTaqポリメラーゼを用いて94℃15秒-60℃15秒-72℃1分-30サイクルで行い、プライマーは以下の配列を用いた。

CRSP:CTCTCTGAGGAGGAATCACG及び GAGTTCAGAGTC
ATAGTAACC
CRSP-2: CTCACAGAGGAGGAAGTGTC及びTAGAGTTCAG
TTCCTTG GTG
CRSP-3: AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びTGCAGTGAAA
GCAACTTGAG
CT-2: AGCAGCTTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTCTG
ATATTCCA
CT: GCCACTCAGTGAGAAGGAAG及びTGAGGCATGAGGGA
TGAAGC
CGRP:GCCACTCAGTGAGAAGGAAG及びTCACCTTACATGT
GTCCCCA
GAPDH: TCACTGCCACCCAGAAGACT及びAGTGGTCGTTGA
GGGCAATG

10

増幅されたDNAは3%アガロースゲルで電気泳動を行い、フジフィルムFLA2000を用いて解析した。結果としてCRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった(図24)。CT-2は図24に示された組織以外に局限して発現しているものと考えられる。

【0064】

20

【発明の効果】

本発明は、中枢神経に発現し、カルシトニン受容体に強く作用する新規かつ有用なペプチドを提供するものである。本発明のペプチドは、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同性を有し、カルシトニンよりも強い作用を有する。また中枢神経系に多量に発現しており、新規なカルシトニン様ペプチドとして骨粗鬆症や鎮痛剤などとして極めて有用なペプチドである。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation
National Cardiovascular Center

<120> A New Peptide Having Production Activity of cAMP 10

<130> PA909444

<140>

<141>

<160> 22 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Swine 30

<220>

<221> modified amino acid

<222> (38)

<223> glycine amide

<220> 40

<223> CRSP

<400> 1

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

10

Gly Phe Lys Val Phe Gly

35

<210> 2

<211> 39

20

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-Gly

<400> 2

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

10

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly

35

20

<210> 3

<211> 679

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP cDNA

30

<400> 3

tcaagtgtct ctgccgttc ttccacagtg ccatgcctg acgccaacgc tgctgctct 60
gtcccttctt ctgtccagt ccacciggt cctgtgccc gaggggcacc atgggcttct 120
ggaaatttcc gcccttctg gtctcagca tctgggtct gtaccaggca ggcatgttcc 180
acacagcacc aatgaggctt gcccttggga gccctttga tctgtctacc ctctctgagg 240
aggaatcacg cctcttttg gcigcaatgg tgaatgacta tgagcagatg aaggcccgig 300
agaigcagaa gcagaggga cagggtccg gcatcaggt ccagaagaga tctgcaaca 360

40

ctgccaccig catgacccat cggctggigg gcttgctcag cagatcigg agcatggiga 420
 ggagcaacct gtigcccacc aagatgggci tcaaagictt tggigggcgc cgcaggaact 480
 ttggatcig agcagigggg tgattccagg aggaaggita ctatgactci gaactctatt 540
 cgtttaattt acaatgaaag caacctacta aaaaatagca tggagacat ccatgtatgc 600
 atgcttcigg aaactgaaaa cactcttttc ctigaaataa actaaaacta aatgcaaaat 660
 aaaatcaatg catcaatgc 679

10

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Swine

<220>

20

<223> precursor peptide of CRSP

<400> 4

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Met Arg Ser Ala Phe
 20 25 30

30

Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ser Arg Leu
 35 40 45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Lys Ala Arg Glu
 50 55 60

40

Met Gln Lys Gln Arg Ala Gln Gly Ser Gly Ile Ser Val Gln Lys Arg
 65 70 75 80

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu
 85 90 95

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met
 100 105 110

10

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly Arg Arg Arg Asn Phe Trp Ile
 115 120 125

<210> 5

20

<211> 3796

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP

30

<400> 5

ctcgaggatc ctgctctctg tticccacaa atcctgcctt cctgtgcctg attccagctg 60
 cctgaatcag acccctgct tgggcacaga atcatcaacc tgcctgcgat taacctccca 120
 aaccgcactt ggacatggta gtcctagggg accggggatg ccttgtaatg ctggactctg 180
 ctctacaaag atcacatagc tgggatgga gagggatg agcctgcgaa accgaacagg 240
 taaagttaac catgacgtca aactgtcctt aaattcctgc tcactttgcg tgtgttttc 300
 gtgggtgccc accaaccctc ccacccctc ccacccctc catcaatgac ctcaatgcaa 360
 atacaagtgg ggtggctctg tggatgctc caggttctgg acgcaagtag tgacacaatc 420

40

ctggggctca ggatctttcc tcctatgggt tgcctggagc tcggggacca cccagattc 480
 agagcggcgg gaataagagc agctgctgggt gcggggaagg gtagaggca ctaccacct 540
 caagtgtctc tgcgcttct tccacagtc catcgctga cgccaacgt gctgctctg 600
 ctccctctc tgcctcagtc cacttggttc ctgctgccc gtaagcccgg agattcctgc 660
 taagctgtgg ttctgtttct ctctccctct cctccctcc ctctctctcc attggatttt 720
 cttagctgat ctcttttccc gtctcaaaagt tctgtccac ttctctctgg gtctcttcat 780
 cctgtaatat gccttactgc gcaattcatt ctaggctcct ttacaggia actctggaig 840
 gtctcagttc ggggattccc tgccttactc ttctgagct gagctgggct ccagtcttgt 900
 ccccgagca gacgtgcta ggiccgigti gggattttgg agctctccag gcacttcagg 960
 gagaggagga tgcaggaata gccttgagca gaagaaacti tcatggaicc catctcctct 1020
 tactacaag gatcgctgga aatggggctg ggacctggga cagtgc aaat ggggtggcaa 1080
 taggtgcaat gactgagggg aaagtagcta ttaaagcaa gcccagttg aaggttctgg 1140
 gaactcccc tcccgaccg ccaccccaat taatcttggg tcccaattta aggtgtgacc 1200
 agcttgttc ttacagggtg ctctttgcca gagtatggag cagctggaca gtaaaattig 1260
 gtctctcagt ttctcagga ttccaactgc agagatatgt cctcccaact cccctcccc 1320
 ccagccaggt ataagcaaaa atcaggcaic agagagatg ctgatgggtt gcactatggg 1380
 aaaagctgtg gtagcagga ctgcgagctt gtctccagg agtcccggcc aacaggttga 1440
 aggtgagagt gtgggtgtgc tgggcagggg gctatggag gagacctct caccagttg 1500
 tccgtctagg ctcttttgt aaaccaaaaca tgttgaggc tcactggatc ttccagcagt 1560
 ccaattggct gaggaggaaa tgatggtgaa aggaaggac acgagcagcc tgaagccagg 1620
 aagccaggga gtggaggca gaggcaggag cagagcccag gtcgtggggc tcaatgaact 1680
 tggaaactgt acaggtgggt acattgttct tcccttgag aggggcacca tgggtttctg 1740
 gaaatttccg ccttctctgg ttctcagcat cctggctctg taccaggcag gcatgttcca 1800
 cacagacca atgaggtaag acagccctgc caacaagcac actcactiga tgagaatgia 1860
 atataaacgt gtatataaat ttattataag gtggctctgt agaacaagg atagtgcctt 1920
 gcgtctctat aagtttatca taagctttat gtgtacacaa agtttgtaaa tagacataag 1980
 atatacagta ctcatgattg taaattttat ataacttacc aaacctcaca gcatgctttt 2040
 ttgttttcat caaatatttg tacttttagc acacgtatat gctcataita ccataattta 2100
 agaaatggat tgtatccaat ttgccaataa ctttgctagt aaatttgita ttaaatciga 2160

10

20

30

40

tatgggatct acacatctca tttttcacct tcattcaaac tgcattaagc taaaattatt 2220
 ttcccatca aactatcaga aaccaggcaa cctggcigt taccctggg aggggcaggc 2280
 aggagatcag aaccigtitt taggcttgct tccctctctt aggtctgcct ttgggagccc 2340
 tttigatcct gctacctct ctgaggagga atcacgcctc ctttggctg caatgggtga 2400
 tgactatgag cagaigaagg ccctgagat gcagaagcag agggcacagg gctccgggia 2460
 aggttcccig cccaaggaca acagggaic cctttcttc tctggtcagg cccaggaagg 2520
 catattitaa agtcactitt gagttttcig acccccctgg acatgctcgt gggatgatt 2580
 tggcatitcc cctgacggcc taggattttc tgcgtgatg acctttctc gcagaaatac 2640
 tcaaggitca ctggctcctt caaggcagia gctttccatg acgattcgt cgtacagcac 2700
 ctgcacitca cctctcactg acgggccttt tctttctta tcccacaaat cagcatcagt 2760
 gtccagaaga gatcctgcaa cactgccacc tgcattgacc atcggctggg gggcttgctc 2820
 agcagatcig ggagcatggg gaggagcaac ctgttgccca ccaagatggg cticaaagtc 2880
 tttggigggc gccgcaggaa ctttggatc tgagcagtgg gatgattcca ggaggaagg 2940
 gactgccctt ttgtacctt cgggtgggag gacagaggac tgggtatgc aggggtgcat 3000
 tccacacctt aacctctgt gagcgcatgg gggtaaaacc tccacatggc aaggctgcca 3060
 caccagigtc tggagaaagg acigataatc cctataactg aaacattggg ctctttctct 3120
 ctgtttctcc agtctctccc tgtgacactg acatcatctg ccaggaaata tagacctgt 3180
 ttacttaaaa cactgttccc tgggtattaa ttggggicca gctctagcat tagaatttga 3240
 aaggtaatga cctacctt ttggagcata ccttacaatg ttatgaactt ggagcataga 3300
 ctcggattca aatactgtgt ctgtcttcca ctaactgtga ccataggcaa gtatgcctct 3360
 gagcctcagc ttctcttgt aactgaagg caacaatagt atccicaata taaaaattaa 3420
 ttagtataac atatgacaag agccgtttaa ctaagaatta ataacatct gtactttt 3480
 tccctcctag gtactatga ctctgaactc tacttcgtt aatttacaat gaaagcaacc 3540
 tactaaaaaa tagcatggaa gacatccaig tatgcatgt tctggaaact gaaaacactc 3600
 tttccctga aataaactaa aactaaatgc aaaataaat caatgcatca atgcagtac 3660
 cttgtgtgca tcttttgtgt atatgattct ataatagat gcatgtctca ttaggtttaa 3720
 tggtagcaaa tctggccct gtcagccaac ctgttgggtg gggcagctct gctaaaccic 3780
 agggcacat gaattc 3796

10

20

30

40

<210> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> Bos sp.

<220> 10
<223> BosCRSP

<400> 6
Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu
1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met 20
20 25 30

Gly Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro
35 40

<210> 7 30
<211> 649
<212> DNA
<213> Bos sp.

<220>
<223> BosCRSP cDNA

<400> 7 40

tgtctctgcc acttctgcc gactgccact gccctctgcc aaagctactg ctgctgctcc 60
 ttctctctgt cccagccacc tggigccggc tgcagagag gtgcatggg ctcttggaag 120
 ttcccccat tcttggtcct cagcatcctg gtcttgiacc aggcaggcat gtitcatgca 180
 gcaccatca ggtctgtctt tgatgggctt ttigatcctg ctaccttggg tgaggaggaa 240
 tcgcgcctcc tactggctgc gatggigaat gactacgagc agatgagggc ccgggagtcg 300
 gagaaggctc agaagaccga gggctccgc atccagaaga gagcctgcaa cactgccacc 360
 tgcattgccc atgccttggc aggcctggctg agcagatctg ggagiatggt gaggagcaac 420
 ttgctgccga ccaagatggg tticaagatc ttcaatgggc cccgcaggaa ctcttggttt 480
 taaacagtga aatgacgctg ggaataaggt caccaggaag cigaactcta ctittagttt 540
 gcatgaaggc accttacaaa aaaagaaaat agcatggaag atacccaigt atgcatgcit 600
 ctcgatatig aaaacatctt tcttticctt gaaataaact aaatgcaga 649

10

<210> 8

20

<211> 125

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> precursor peptide of BosCRSP

30

<400> 8

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Val Phe

20

25

30

40

Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Arg Ala Arg Glu

50

55

60

Ser Glu Lys Ala Gln Lys Thr Glu Gly Ser Arg Ile Gln Lys Arg Ala

65

70

75

80

10

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met Gly

100

105

110

20

Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro Arg Arg Asn Ser Trp Phe

115

120

125

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

30

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP

<400> 9

Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu Leu

40

1

5

10

15

Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Tyr Asn

35

10

<210> 10

<211> 686

<212> DNA

<213> Canis sp.

<220>

20

<223> CanisCRSP cDNA

<400> 10

tcgccacat ccacgggtgcc atcgctgac atcggacgcc aacactgcc aagctgccgc 60
 cgcctgtgct ccgagccacc ggctgccatgc agacagagaa gcgtcatggg ctcttggaag 120
 ttctcccttt tcttgggttct cggcatccig gcgtgtgacc aggtgggttt cctccaggca 180
 gcaccattca ggtctgcatt ggaaaatcct ccagactctg ggtgtcgcaa tgaggaggaa 240
 ttgcgcctcc tcttggctgc agtgaigaag gactatatgc agatgaagac tcatgagctg 300
 gagcaggagc aggagactga ggcctccagg gtgtgtgtcc agaagagatc ctgcaactct 360
 gccaccigtg tggccattg gctgggaggc ttgtgtgagc gagccggaag tgtggcaaac 420
 accaacttgc tggccaccag catgggttgc aaggcttaca atcgacgccg cagggaactt 480
 aaggcttaag cagtgcacatg accccaggaa gaaggtcacc atgaagtga cttactttct 540
 cttactttct aatgaaaaca acitattagaa tgcagagcat ggaagacaca tacatatgca 600
 tgcitactat taaaacattg tgtcttgttt gaaataaagt aaaactaaat aaagagaata 660
 aaatcataaa aaaaaaaaaa aaaaaa 686

30

40

<210> 11

<211> 127

<212> PRT

<213> Canis sp.

10

<220>

<223> precursor peptide of CanisCRSP

<400> 11

Met Gly Phe Trp Lys Phe Ser Pro Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Ala
1 5 10 15

20

Leu Tyr Gln Val Gly Phe Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu
20 25 30

Glu Asn Pro Pro Asp Ser Gly Val Arg Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Ala Val Met Lys Asp Tyr Met Gln Met Lys Thr His Glu
50 55 60

30

Leu Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Arg Val Ala Val Gln Lys
65 70 75 80

Arg Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu
85 90 95

40

Leu Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser
 100 105 110

Met Gly Phe Lys Val Tyr Asn Arg Arg Arg Arg Glu Leu Lys Ala
 115 120 125

10

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

20

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-2

<400> 12

30

Ser Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Asp Ser Lys Ile Leu
 35

40

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Swine

10

<220>

<223> CRSP-2 cDNA

<400> 13

```

ctcaagigtc tctgccgett ctccacagt gccatgcct gacgccaacg ctgctgccic 60
tgctccctcc tctgctccag tccacctggt tccigcigcc cgaggggcac catgggcttc 120
tggaaatttc cgccttctt gggtctcagc atcctgggtc tgtaccaggc aggcattgtc 180
cacacagcac ccgtgagatt gccttiggag agcagcittg attcigccac tctcacagag 240
gaggaagtgt cctttctact gggtgcaaig gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgctggagc aggagtcaga ggacttcagc atcactgccc aggagaaaic ctgcaacact 360
gctagctigc tgaccacaa gatgacaggc tggctgagca gatciggagc cgtggctaag 420
aacaacttca tgcccacaa tgggacttcc aaaatcttgg gctgacgccg cagagagcct 480
caggccigag ctgtgaaatg atccacaaa gaaggtcacc aaggaaciga actctatttc 540
ttttaatctg caatgaaagc aatttatttg aaaaatagca tggaaaacac acatataatg 600
atgtttcttg cttgaaatac agcttttagc ttgaaataaa ctaaaaciaa atgcagaata 660
aaatcatigc agctacciga aaaaaaaaaa 690

```

20

30

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Swine

40

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-2

<400> 14

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1 5 10 15

10

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Val Arg Leu Pro Leu

20 25 30

Glu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Leu

35 40 45

20

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50 55 60

Leu Glu Gln Glu Ser Glu Asp Phe Ser Ile Thr Ala Gln Glu Lys Ser

65 70 75 80

Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu Ser

85 90 95

30

Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val Asp

100 105 110

Ser Lys Ile Leu Gly

115

40

<210> 15

<211> 7673

<212> DNA

<213> Swine

<220>

10

<223> gene CRSP-2

<400> 15

```

ggatccacta gtcttagata aaatggacaa atacctagaa acagaagacc taccaagaig 60
gaaggatgaa gaaatagaaa attcaaatac acctatgact aggaaggaga atgaagcaat 120
aatccaaaaa ctccaacaa agaaaagccc tggatacgat ggccicatig gigaatagta 180
ccagacattt aaagaaaacg aataccaatc ctgttcaaac ttctccaaaa acctgaagag 240
aaaggacaca cctaaccta ttctatgagg caggccaaca ttactctgat accaaagaig 300
gagaaagatt ctgcaaggag aaaaccccta cagacaaaat cctttatgac atggatgtgg 360
aaaccctcaa cagtatgcta gggaattgaa ttcaagaagc tattaaaagg atcctacaac 420
atgaccaagt gggaatgaat tciggaatgc aaggatgatt caaaataiga aaattgatca 480
aagtggtata tcacaataat ggaatgtagg gaaaaacaca cctgattatt tccactgata 540
cagaaaatta tttagtaaaa ttcaatacct tticaggatt aaaaacaaaa actaggtata 600
gaaggagact gcctcagcac aatacaacta tatatgaaaa accaacacca acaccataat 660
ccaggigga aaactgaaag cttttccctt aagatcigga agaaaatgga aaaaaatttt 720
taagaatttt cagacagatt tgggtctctg gtacacictg agaaatcatt ttttagaatt 780
tttttttttt aaaaataagc acaagaattt catftaaaag aagggaata acatagccit 840
cagagtttat caggaggigt aatttttttt tccacactag attgiggcta cctgatgcta 900
atittgaggt ttaaataaa tgaataaga ttgtacagcc aagtgccagc tagtcatgga 960
acttttacct cagtactgtt tagtgcttca gtcttaagaa gtctcaggga gggctgcgig 1020
caatacaagt aatcgggtact tgcigaaggt ctaaaattc gagtgcactt ggtaaatcag 1080
ggatggcgcg agaggagact ggttcigtaa ctcagactag tgaacccatg aatttagaaa 1140

```

20

30

40

gggtaacitit gggciccaag caaatccigt tctacciaac taggtccaaa tgcctcgcag 1200
 gctgtagtta gagccctctc atagcagggg gactgccttg gtgaatcgc cagaggaaat 1260
 gaatttccat tcacattcat tcaacaaaca ttgggcgagt gccacctcat gtgcaaaaca 1320
 tgggtcctaag tgcataagaa aagatgttgt ttigttaaact taccgcgagc tcagagccag 1380
 gacttcttgg aaagtcagag gacttgagga aggagttcat ctacagccct ccttcacttg 1440
 agagaciggc tttcttttcc aagtaaagct taaaacigct ggaggctaag ttagcaccct 1500
 ctgggggcag accctgattc ctgcccctca tccccagccc ttgtgtgtgt ggcgccaag 1560
 attctgagt gaggaatgaa tgttggcttt gaacaggaaa ggcacaagtg gcagccaagg 1620
 gtagaatgct gagcctacaa attaacatag ttacaaattt gttcttctaa ggagtcgttt 1680
 cttagccata gtgcagccac ctttgcattg atcaaaactg tggttcttcc aatgaaaaaa 1740
 gacatcccca gacacacata cttacaaatg atttcagaag atgataggt cggaaatctc 1800
 aggttttggg ttttatttgc aaaagcgttt tgcgccigag ttttaaactt ttttttttt 1860
 ttttttttt tgtatttttt cacttctagg gcggtctcgg cggcataagg aaattcccag 1920
 gctaggggtc taataggcgc catagccacc ggcctacgcc agagctactg caacgctgga 1980
 tccgagccgc atctgcaacc tacaccacaa ctacaggcaa tgcgggatcg ttaaccact 2040
 gagcaaggcc agggatcgaa cccgcaacct catggttctt actcagattc gtaaccact 2100
 gcgccacgac ggccactcca acctaccaga ctcttaatta agtagcagag tccaatttac 2160
 atgccgcacc acatctgita ccccgagtta gcgaacttgg tcttggaact aactctctac 2220
 ggaaagccaa gccgagtact cataattata gtgctgaacc cccaaacctt ggtctggcct 2280
 gtgcacccaa ttttgcctg tagtagaaac caggatttac ggagcccgag cagtccgcca 2340
 tccigaactc tctcttttct cacttgcct tcatccigga gtgcaccigc cctctatgaa 2400
 ccagtttttc cgttcccttg gtctcccgat ccgttgctta tccigaggag agcgagatgc 2460
 aagcaccgga ttccctagcc ccaatatttt attctcttgc gaaggagaaa agtgaataa 2520
 gggatctctg taaatgagat gtcccgagtc cagagagcac aaaccggcaa ggggaacaga 2580
 tgtccgcga ggcagggtgt cggaaagata tagagaaggc tcaggttcgg acctgtggct 2640
 caggtcacac tcatggcaga gtccggttta atttcggctc tgcctggggg aaccacttaa 2700
 ctgggttctt tgcctccctc caccggcccc cgaatgctgt gcagcgtttg ccgcgctgga 2760
 gggctgttac aggcctgtgc ggtttatcgc tgtgtgtctc gacacggiga tctgagcag 2820
 catccgaact ggatgggggt agatgggggc acagggtcgg aatcacaggt cactggaaca 2880

10

20

30

40

tcttggcaaa cagcagccgg aagcaagggg cagctgggca aatggttctg ggacattgat 2940
 gggcttagat gatgaatggt ggggctggag gtcggcttgg cggcttggga agcatctatg 3000
 ccgtgcacgt ccttgcctaa gccagtagg gcaccaictt tccccatatg gtggaccgac 3060
 caccagcgc gactccagac atccgcacag aggtggggat tgggcaaatg gatcgcgatc 3120
 gcacagaatc cctctgcac ttccciggia agctcttctc gatccctccc tgggtggaga 3180
 gcaggtagat ggctactaat gataccatc ctigaagacg ggaatatgat gccccgttcc 3240
 aaaaattaat atatigaggt gctagaagac actagcccgga tgatcttact acctagaaaa 3300
 ggcacagctg gaacaaagt tccgtgtgac aaagacigtg atccgtctc ttgtttccca 3360
 caaatcctgc ctctctgtg ttgattccag ctgcttgaat cagacccctt gcttgggcac 3420
 agaatcatca acctgtgtcg cattaaccic ccaaaccgca ctggacatg gtagtcttag 3480
 gggaccgggg atgcttctga acgttggact ctgctctaca aagatcacat agctggggat 3540
 ggagagggat gtgagcctgc gaaaccgaac aggttaaagt taccatgacg tcaaaactgc 3600
 cttaaatcc tgcctacitt gcgtgtgtt ttctgtgtg cccaccaacc tccccaccc 3660
 ctccccccc cgccatcaat gacctcaatg caaatacaag tgggttggc ctgttggatg 3720
 ctccaggtt tggacgcaag tagtgacaca atcttggggc tcaggatctt tctctcatt 3780
 ggttgcctgg agctctggga ccacccaga ttacagagcg cgggaataag agcagctgct 3840
 ggtgcgggga agggtagag gcactacca cctcaagtgt ctctccgct tcttccacag 3900
 tgcctegcc tgacgccaac gcctgtcct ctgtctctc ctctgtctca gtccacctg 3960
 ttctgtctc ccgttaagc cggagattc tgcctaagct tggttctgtt tctctctcc 4020
 tctctctct tctctctc tccattggat ttcttagct gatctcttt cccgtctca 4080
 agttcctgc cacttctct tgggtctct catctgtaa tatgccttac tgcgcaattc 4140
 attctaggct ctttccacag gtaactctgg atggtctcag ttccgggatt cctgtctca 4200
 ctcttctga gctgagctgg gctccagct tctccccga gcagacgtg ttaggtccgt 4260
 gtgggattt tggagctct caggcactt agggagagga ggaatgcagga atagctttga 4320
 gcagaagaaa ctttcatgga tcccatctc tcttacctac aaggatcgct ggaaatgggg 4380
 tcgggacctg ggacagtga aatgggtggc aaatagggtc aatgactgag gggaaagtag 4440
 ctattaaacg caagccccag tgaagggtc tgggaactc cctccccga ccgccaccc 4500
 atttaattt ggttcccaat ttaaggctgt accggctgt ttcttaccag gtgctctttg 4560
 ccagagiatg gagcagctgg acagtaaaa ttggttctc agtttctcag ggattccaac 4620

10

20

30

40

tgcagagata tgcctccca actcccttc ccccagcca ggtataagca aaaatcaggc 4680
 atcaggagag atgcigatgg gtigcactat gggaaaagct gtggigacag gtactgtgag 4740
 tctgtcctcc aggagtcgg gccaacaggt tgaaggigag agtgiggig tgctgggcag 4800
 ggggctatgg acggagacct tctacccag ttgtccigt aggcctcitt gctaaaccaa 4860
 gcatgttgca ggctcacigg atcttcagc agtccacttg gctgaggagg aaatgatggt 4920
 gaaaggaaaag gacacgagca gccgaagcc aggaagccag ggagtggag gcagaggcag 4980
 gagcagagcc caggctgtg ggctcaatga actiggaact gctacaggig gtgacattgt 5040
 tcttcccttg cagaggggca ccatgggcit ctggaaattt ccgccttcc tggttctcag 5100
 catctggic ctgtaccagg caggcatgtt ccacacagca cccgigaggt aagacagcac 5160
 tggiggcagt gctctcgctt cccacggccc ccggaatcat atagtctgt attgtgagt 5220
 gtgctiggti gagtctggct ctggigggc ttctgtgtat aggggtgtg gggctcctaat 5280
 gtaigaatat agtcagtat ataagittat tataaatatt ttgtgateca agataataic 5340
 acaaagitta caaataaata gaagatatac agtattcact ataaattict aaactcacig 5400
 aaccttacag catgtttttg ttgcttttia tgaatgttt ataacttiag caaacctata 5460
 tagtaattta gccataattt gagcaatgaa ttgcattcta attagtaat ttgtcaataa 5520
 attgttatt aaatctgaaa ggtaatctat acaatttct accctcttcc aaattatait 5580
 aatatgaaac cattttcata ttcaaactat catttaattt ttaataatgg ctgtatttaa 5640
 cactaagctc atacaattcc tgaagatcia accatcagct ttcaaaagcc tacatgatgc 5700
 actttcagca gaactacitt gtggacaccc cagagcctaa ctcatggiga agcagcatit 5760
 ttgatgaac actagccita tgcctgacc gtigagaatt tcatcagcct tattctcaga 5820
 ggaagtggca gaaaccagga aatctggcig ctatctctag ggctgttgta ggctcagagc 5880
 gcatgtiggc ctigtcttcc ctcccagat tgcctttgga gagcagcitt gattctgcca 5940
 ctctcacaga ggaggaagtg tccctcttac tggttgcaat ggigaaggat tatgtgcaga 6000
 tgaaggccac tgtgtggag caggagtcag aggacttcag gtcagtcitt gcaccctcc 6060
 cagaatatgg ctacccctct ccttagagia ccaggaagcc atatccttaa gaatgagatt 6120
 tgttatagt ccataagcct tgaatgccag tctcataagc ctgggtttat ttttagttia 6180
 ttacacagga gagattgtct attacagtic tgatttcag gtccagtaat gcagagccac 6240
 cttgggttt tctgacaccc ctgaaaatgt ctatggggag tgatgatgca ttttccaaa 6300
 agccctatgg tttctgttg ggattttgt tttagcagaa acatttcagg ttacatggic 6360

10

20

30

40

cctctcagag ctgtaatit ccactgatgg tcagtcctgg ggggaatcac ttgcccitcaa 6420
 gctgtcatig gcaggccitc tctttgtctc catcctgaaa atcagcatca ctgcccagga 6480
 gaaatccigc aacactigctc gctgtigigac ccacaagatg acaggctggc tgagcagatc 6540
 tgggagcgig gctaagaaca acttcatgcc caccaaigtg gactccaaaa tcttgggcig 6600
 acgccgcaga gagccitcagg cctgagcigt gaaatgactc cacaagaag gigactigctc 6660
 tagaacatgg gatagcaggg caaatggcig ggtatticag gggigtggc tacactctaa 6720
 ccttccctga gccigtactg taaaaaaaaa tccataatga agttgtctgac cccattatcc 6780
 tcagaaagaa aagagaatcc taatagccaa aacccctata acttaggttc atttctatit 6840
 tttccagig tctcccagtg actctgaggt catctgicag gaaacataga ttctattcct 6900
 tttcttttc ttttggcta cacccaaggc atgtgaaagt ttttggcca gggattigaat 6960
 ctgaaccata gctigigacct atgcagtacc tgtggcaaca ctggatcctt aacccaatgt 7020
 accacatcag gaactcciaa gtctattat ttaaaacact gtccctgca gttataatig 7080
 tgattattct agtttttag tttgaaagg taaatctta tccagttagt ttgaagtata 7140
 actacaatgt cacatatatc tgaaticaga gcattgactt ggtttcaa tgcgatgtctg 7200
 tcttccacta actatacaac catgggcccag accctctctg aacctcagtt ctacaigaaa 7260
 ctttaaggca acaataatat ttaccigtta tcattaatat aaaaagtaac tgagataait 7320
 catggtaaga gcctcactat taataagtaa taatatctta gctctatit tttttctcc 7380
 taggtacca aggaactgaa ctctatttct ttaatctgc aatgaaagca atttatttga 7440
 aaaatagcat ggaaaacaca catatatgca tgcctcttgc ttgaaataca gcitttagct 7500
 tgaataaac taaaactaaa tgcagaataa aatcatigca gctacctgat atgtatcatt 7560
 ttaatatitg attctgtatt ctataagtat gactcaigtc tcgctggcct atctggtagc 7620
 aaatctggac cctgtcagcc aacctgttgg tggtagcagc tctgctaaac ctc 7673

10

20

30

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

40

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-3

10

<400> 16

Ser Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met

20

25

30

20

Gly Ser Lys Val Leu

35

<210> 17

<211> 685

30

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-3 cDNA

<400> 17

40

gcccagctta cgtctcctt ctccgccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgttgc 60

ttctccact tgggtccaa gctacciggt tccigcatcc agagggcac catgggcitc 120
 tggaaatcc ccccttccct gatccacagc atccctggtec tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc catcaggat ggccttggga agcagccttg attcigccac actcacggaa 240
 gaggaatgt ccttctact ggttgcaatg gigaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgciggagc aggagacaga ggacttcagc atcaccacc aggagagatc cigcaacact 360
 gccatcigtg tgaccacaa gatggcaggc tggctgagca gatcgggag cgtgggtaag 420
 aacaactica tgcccatcaa catgggcicc aaagtcitgg gccggcgccg cagacagcct 480
 caggccigag ctgtgaaatg actctaaaaa gaagtigaac tcaagttgct ttacttgcaa 540
 agttgcttic cctgcaaatt aaaagaacca atttgaaaaa tagcatggaa gacacacata 600
 tatgcatgct tcttgcttga aatacaacti ttgtcttgaa acaaactaaa cctaaatgca 660
 gaataaaaac atigcagtta cctga 685

10

<210> 18

20

<211> 125

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-3

30

<400> 18

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

40

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Ile Thr Thr Gln Glu Arg Ser

65

70

75

80

10

Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met Gly

100

105

110

20

Ser Lys Val Leu Gly Arg Arg Arg Gln Pro Gln Ala

115

120

125

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Swine

30

<220>

<221> modified amino acid

<222> (33)

<223> Serine amide

40

<220>

<221> modified amino acid

<222> (1)

<223> pyroglutamic acid

<220>

<223> CT-2

10

<400> 19

Glu Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

1

5

10

15

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

20

25

30

20

Ser

<210> 20

<211> 802

<212> DNA

30

<213> Swine

<220>

<223> CT-2 cDNA

<400> 20

gcccagctta cgtctcctt ctcgccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgttgc 60

40

ttctcccaact tgggctccaa gctacctggt tcttgcattc agaggggcac catgggcttc 120

tggaaagtcc ccccttccct gatccctcagc aiccttggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggccttggga agcagctttg attctgccac actcacggaa 240
 gaggaaatgt cctcctact ggttgcaatg gigaaggatt atgigcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc ciggacagct ccagagctaa gcagtgcatt 360
 aatcigaglia cctgtgtgct gggaacatat acatgggacg tcaacaagtt ttatgcattc 420
 cccttaacta caactgggat tagagtatct ggcaagaaat gggtcagggc cagagtcica 480
 gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat accctaaggt gcttaagaag gccccacc 540
 ctccctcttt ctagtccctc tccitagaatt tgcattgtgtt ctctcttggt tgcctctga 600
 gctgctatca gcagctttcc ttgtggccat ggaatgtctgg aatatcagag aggaggtggg 660
 gggtaggggc aggcaggcca gaagaaaatc actcaggaat agattaggag agaatgggca 720
 gcccgtgag tgcctgtgga ttacacagca gagcttctca gtccctgctt tgaacatgct 780
 tticactagg gaataaaaagt at 802

10

20

<210> 21

<211> 162

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CT-2

30

<400> 21

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

40

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Leu Asp Ser Ser Arg Ala Lys

10

65

70

75

80

Gln Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

85

90

95

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

100

105

110

20

Ser Gly Lys Lys Trp Val Arg Ala Arg Val Ser Glu Lys Val His Tyr

115

120

125

Pro Ser Arg Gln His Thr Leu Arg Cys Leu Arg Arg Pro Pro Pro Leu

130

135

140

30

Leu Leu Ser Ser Ser Ser Pro Arg Ile Cys Met Cys Ser Ser Leu Val

145

150

155

160

Ala Leu

40

<211> 7142

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene of CRSP-3 and CT-2

10

<400> 22

taccggcccc cccctcgagg tcgacgggat cgataagctt gatatcgaat tccigcagcc 60
 cggggatcc ttaaccaact gagggaggcc agggatigaa ctgcgccctc atggatacia 120
 gtccggittg ttacaccica gcaacgggaa cccccciggt cacttgaag agggttttca 180
 tacagatcct cccacctccg ctatcagtga cctcaatgcg aatacaagtg cggtaggttct 240
 gttaaattct ccaggttccg gaagcaagia ccgacataat cctctggggg ctcaggattt 300
 ttccccicat tggttgcctg gagttccagg accaccttgg attcacagca gcgggaataa 360
 gaggagctgc tggtagctag aggcattaga agcactgccc agcttacgtc tctttctcc 420
 gccagtcca tcacctgcca ccagcgcggg tgttgcttct cccacttggg ctccaagcia 480
 cctggttcct gcatccaggg aagtcctaaag attctgctta gcctgattc tatttcttct 540
 ctccctctcc tccctctcat ttctctccca ttacttttcc ttgcccgtct cagaggtctt 600
 atccatttcc ctccggagtc ctctatcact caatctatta cgcgatttat ctccgggtcc 660
 tttaacaggg aacactaaac ggctcagtt ccagacactg agcttggctc cagttttgcg 720
 gtctccctgcc gcatatgtgc ttaggttaat cttaggaagc tggagcttcc tcaagcaatg 780
 cgggctgagc agaacgcaga atatctttgt gtagaccgtg agctcagggg aacctctctg 840
 tgcctagctg tctgcgggaa atagactcat ttgggaatgg attcggaact tagaccaggg 900
 gaagcgggtg gcaaatagat gcaaagactg aggggcaggg agccattcaa ctgcaagtcc 960
 tagctgccag ttgggggagt tttttggttg ttttttctc cccagtttaa gtctgtgtc 1020
 ctaatttaag attccaccag ctgtttttt acagggtact ctttgccaaa gtttgaagca 1080
 gctgagcagt agaatttggg tcttcagttt cttagtgatt ctaaccacag agatatgtcc 1140
 tcccaatccc cctccccctg cagctatgag caaaagcctg gtccctggaa gacaactctg 1200
 ggtagcatta tgtgaaaagc tgggtgggt tactccgagt ttgtcttcca ggagtcctgg 1260

20

30

40

ccaagagggt gcaggigaga gagtigitgg tactggggag ggggcaatgg actigagacca 1320
 cctcaccagc atgttctgggt aggtttcttt gctaaaccaa gcatgctgca agcgacttgg 1380
 atatttcagc agtgcacttg gctgaggaga aaatgaiggt gaacigaaat gatatgacca 1440
 gccitgaagcc aagaaaccag ggagtttagag gcagaggcag gagcagaatc cagggctctgt 1500
 aggtcatag aactiggaac tcctacaggi ggtgacatta ttttccctt gcagaggggc 1560
 accatgggct tctggaaggt ccccccttc ctgacctca gcatcctgggt cctgtacca 1620
 gcaggaatgc tccaigccgc gccattcagg taagccagcc ctgccaggag cccctcacc 1680
 tccctcaacc cctgaaatct tagagttctg tgttagtgg tactatgctg aatatggctc 1740
 tctgtgggt tgtgggggtg tgggtccctg atgtacgaat gtaaacttgt atacaagtta 1800
 atcagaaaatg ttttaggagg ctatgtatca caaagtttac aaataaaca aatatatagt 1860
 acttgttatt tcatataacg cacigaacct cacagcatgc tgcatttgc ttttctcaa 1920
 cattgtiacc tttagcaac ctatttacta atttaccat actttgagca gtgggttaca 1980
 tcttaatctg ctaattactt taccaataaa ttgtttatta aatgtgat atgtgtccata 2040
 catctaattt ctaccctca ttcaaattat attagataa atattttcat attcaaaia 2100
 tcattatcat ttattgttta ataattggctg tatttaacac taagctcata cagttcctga 2160
 aaattaccat cagcttcaa aagcctatat gatccacct cagcaaacct cttcttttag 2220
 gtcaccctag agcctaactc gtgggaagc agcattttg catgaatact ggctcatgt 2280
 ctgtctgtt gagtttgggt ggccacatcc tcagtggag tggcagaaat gaggagttag 2340
 ggttggggtg ggctcagcac atgttgggtt tgccttccct cccaggaatg gctttgggaa 2400
 gcagcttga tcttgccaca ctacaggaag aggaaatgt cctctactg gtigcaatgg 2460
 tgaaggatta tgtgcagatg aaggccactg tcttgagca ggagacagag gacttcaggt 2520
 cagctctgc accctccca gaataaggct taccctctcc cctggagiac caggaaggca 2580
 tgcgcgigtg catgcacatg cacacacaca cacacaggta ggagagagca cagctagaca 2640
 ggcagcctgg ggcacaactc tctacagggc tccactaaa tcataggica tgtggaagaa 2700
 ccacagataa aaacattctt tctigaaagc agtaggggaa gccgtgagat cacctacagt 2760
 ggaaattttg tagcagtact tgggagacct cccagcactg gagtttagcc ttgtaaggta 2820
 aagccaggga atgaatctca tgtatctcag gagatttag aaatttggct cttctcgtt 2880
 aacctgcca tgatattctt tcacacctgc aaggcatctt cattgcacat ttgcaaggig 2940
 aagccagagc acttagaaaa gatgagtcag gttaggcagt tctgaaata ggtctgaggc 3000

10

20

30

40

ctttagatgt gtagaatctg tggagatgig catgtttca tggggccaga cacctttctc 3060
 cagtcccaac tctcigtgca ctgagittac tgttcaface agctcctgac cgagctgtac 3120
 ctgggcagag gcatgigctg cacctttatc cgcictaaga acctcigigc agagcataaa 3180
 ggtcigagca gcatgtggaa tggcagaaaa ggctgtccct ccccaccaca gcccttcccc 3240
 acatgcctct ggctcagiga acctcigcat cctcctaatt gaggaigcat gagccgcctt 3300
 ctgcttgcc cctcctgccc tctgtccag gtccccctt cctggctcaa cttctgcat 3360
 gactgcccct gggggcagcc ctggtgcatg gtattgtctg gcatgtctt tccctgcagc 3420
 ctggacagct ccagagctaa gcagtgcatt aatctgagta cctgigtgct gggaacatat 3480
 acaiggagc tcaacaagtt ttaigcatt cccctaacta caaciggat tagagtatct 3540
 ggcaagaaat gggtcagggc cagagctca gagaaagtc attatccctc aaggcagcat 3600
 accttaaggi gcttaagaag gccccacc cctctctt ctagttctt tcttagaatt 3660
 tgcattggtt cttctctggt tctctctga gctgctatca gcagcttcc ttgtggccat 3720
 ggaigtctgg aataicagag aggaaggagg gggggggggc aggcaggcca gaagaaaac 3780
 actcaggaat agattaggag agaattggca gccctgigag tggcigtgga ttccacagca 3840
 gagcttctca gtctgtctc tgaacatgct ttccactagg gaataaaagt atgtttctaa 3900
 aaacacctga gctatagttg ccatgtcaca tgcctcatgg atacagagac ttgtctgtca 3960
 agtagcctta gtctgggtta gctggagta gggcatggtg gggtgtccct ggagcaacct 4020
 caagtigcaa aatcaggagc actaaggaa aaaacaagca cctciggagc ttgatgtac 4080
 aaactcactt cctctgtcag gaagacaggg gaactttctt tttctaaagg agtactcagt 4140
 acctctgaat gggaggcacc ttccagacaa gtcttaaga atgggttgg gtgtgccacc 4200
 aaaatctctc tatgtcttgg ttaaatttta gtttactgt acagaaaaga ttggctgtta 4260
 aagttcigtg ttcttggct tgttggccag agcacattg ggtttctga cacctctgga 4320
 aatgtctatg gagagtgat atggcatttc cccaaaagcc ctatggttt ctgttgggat 4380
 ttgtgttta gcagaaacat ttcaagttca ctgttccctc tcagagctat aattttccac 4440
 ggaiggicag tcttgggggg aagcaccctg cctcaggctc tcactgacag gcccttctt 4500
 tgtctccatc ctgaaaatca gcatcaccac ccaggagaga tcttgaaca ctgccatctg 4560
 tgggaccac aagatggcag gctggctgag cagatcggg agcgtggta agaacaact 4620
 catgcccac aacatgggt ccaaagctt gggccggcgc cgcagacagc ctgagccctg 4680
 agcigtgaaa tgaactaaa aagaaggiga ctgtctaga acctgggtta gcaggcaaa 4740

10

20

30

40

tggctgggta ttgcagaggt gctggccaca ctctaacctt ccgtgggcct gtattataaa 4800
 aacatccaca gcaaaaagggc caaccctagt gtccagagaa agaacagggc cccaagagct 4860
 gaaatcccta gaatttggaa tcacttctat ttttttcagt ttctcccagt gatctigaga 4920
 tcatctgcaa ggaaataatag atcctaigaa tttaaaacac tgttcccgc acttacaait 4980
 gccattgtag gttttgagtt ttaaaggtaa tgaicctatc caatgagttt gaagtataic 5040
 gtacaaigtc acgtacacct gaattcagag catagacttg gtttcaaatg tgaigtctgt 5100
 cctctactaa ctataigacc atgggccagg cctctctgc gtctcagcct ctacaigtaa 5160
 ttttaaggca aaaacagiat ctaccigtta ttgttaatat aaaaagtaat tgagataait 5220
 catggcaaga gccitcaaat taataataaa taatatecta gctcttgitt ttttttctc 5280
 ctaggtcacc aagaagtiga actcaagtig ctttactgc aaagtigtct tccctgcaa 5340
 ttaaaagaac caatttgaaa aatagcatgg aagacacaca tataigcatg ctctctgctt 5400
 gaaatacaac ttttgcctg aaacaaacta aacctaaatg cagaataaaa tcattgcagt 5460
 taccigatgt gtatcttttt aatatttgat tctgtattct gtaagtaiga ctcatgtctc 5520
 actggcitat ctggtagcaa atctggacc cgtcagccaa cctgttggtg gtggcagctc 5580
 tgcataacct caggagcaca tgaattgct gccctaiggg tgcctgggga tgcacagaaa 5640
 tgtigagcct cagtgggaacc tttaaagaaa tggctctigga attcccatca tagctcagtg 5700
 gaagcaaatc tgaccagcat cgataaggat gccggtitga tccatggcct tgcccattgg 5760
 gtcaaggata tgttgttgcc atgagctgig gtataggta caggcgcagc tcagatctgg 5820
 catgctgig gctgtggat aggccagcag ctgcagctcc gattcaaccg ctagcctggg 5880
 aacctccatg tgcctcaggt gcggccctaa aaagacagaa aaaaagaaga gaaaaaaaaa 5940
 tgtctcatt tgttcactc atcaagccag aaaatgtatt ttcagtacac ttaaaaggag 6000
 tccctgctgc tatttatgct gtttcccca taagaacctc agggaccigt gaacacttgg 6060
 ttgaccaggt tgcataaatg aggcaataic gtgcttgggg tgggiccca gtatccigia 6120
 ctctcagtgt ctagtgaac atccttatgg gattagaatc ctctgcatc cagagagaca 6180
 ttacattct cagagggcac cctggttccc agccccagaa gttatctgtt ctctctctcc 6240
 ttgactcagg ttgccccta tccatcccig ctttctctc ccaacagctc ctctttacac 6300
 atcctatagc ctgcaaaacc ctttagagca atggctcaca gcttgaaagg gtatcgaga 6360
 ctggcagacc tggaaaggc ctcagaigcc atctaacca actttttact ctggaagtig 6420
 cagagaagga aaattatgtt gctcagggc ctgcaatac ttatagagac atccctatat 6480

10

20

30

40

ttaagaaata ataattgagt gtctgctatc tctttgacac tatttaagct ccaggaatag 6540
 agcaataaac agaacagaca aaacccccig caticatgga gcttataitc taactggaag 6600
 agactgaggt gatacatgct ctggaattag aaacaticag cactggaagg aatctgggat 6660
 gtcataaggg tataaaggct tatttgatat agctatitca tgggatcaac atccctggca 6720
 tatgctggca atgciggita ccatcigtig actatgacti ccaaggigac tggacagcca 6780
 gtttcattgg tggacagica attaagtggg atattttcca ttagagaagt catccctac 6840
 tacctacaga ttatagttaa ttcctaagaa gcacatagaa ttatgaccti tcicccatic 6900
 attctgiagt catcacagta acccaacctt agccataaag gtagatcaga ccatgtctcc 6960
 cttaggacag aatactctat tatagactcc ccttctcaca aagtaaacaat ttaggcatt 7020
 gcagtgtctt cttaatcaac tctacttggg cagagtatat gtattaaaat ttacttccaa 7080
 atttggaaat ccttgggtgg taaggatcca ctagtcttag agcggccgcc accgcggtgg 7140
 ag 7142

10

【図面の簡単な説明】

20

【図1】図1は、本発明のペプチドのCRSPの構造を模式的に示すものである。

【図2】図2は、本発明のペプチドのCRSP (pCRSP) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドI (hCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドII (hCGRP-II)、ヒトアミリン (hAmylin)、ブタカルシトニン (pCT)、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図3】図3は、本発明のペプチドのCRSPの発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を示す図面に代わる写真である。図3中の矢印は、CRSPの位置を示している。

【図4】図4は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPのcAMP産生活性を検討した結果を示すものである。図4の縦軸はcAMPの産生量 (pmol/10⁵細胞/30分)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 (-log (ペプチド濃度 (M)))を示す。図4の黒丸 (●) は本発明のCRSPを示し、白丸 (○) はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pigCGRP)を示し、白菱形 (◇) はブタカルシトニン (pigCT)をそれぞれ示す。

30

【図5】図5は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図5の縦軸は各イオンの取り込み量 (cpm)を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。***はp<0.001で有意差があったことを示す。

40

【図6】図6は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図6の縦軸は各イオンの取り込み量 (cpm)を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPとEIPAを示す。***はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図7】図7は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるカルシウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図7の縦軸は各イオンの取り込み量 (cpm)を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加)を示し、その右はsCT (サケカルシトニン)及びCRSPを示す。*はp<0.05で、**はp<0.01で有意差があったことを示す。

50

【図8】図8は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴って合成されたDNA量の測定結果を示す。図8の縦軸は¹²⁵I-DUの取り込み量(×100cpm/ウェル)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-log(ペプチド濃度(M)))を示す。図8の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン(ブタCT)を示し、白菱形(◇)はサケカルシトニン(サケCT)をそれぞれ示す。

【図9】図9は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴う細胞数を計数板にて計測結果を示す。図9の縦軸は細胞数(×1,000細胞/ウェル)を示し、横軸は左端はコントロール(CRSP無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。*印はp<0.05で有意差があったことを示す。

【図10】図10は、遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞(COS-7)における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図10の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/30分)を示し、横軸は各ペプチド(リガンド)の濃度の逆対数(-log(リガンド濃度(M)))を示す。図10の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。

【図11】図11は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図11の縦軸はcAMPの産生量(fmol/ウェル/1時間)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図11の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。

【図12】図12は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コントロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12中の***印はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図13】図13は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血中カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の**印はp<0.01で有意差があったことを示す。

【図14】図14は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血圧の変化を測定した結果を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。

【図15】図15は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させた細胞に対し、CRSP又はCRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/130分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。

【図16】図16は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのブタCRSP、ウシCRSP及びイヌCRSPのcAMP産生促進活性を検討した結果を示すものである。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/10分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図16の(■)はブタCRSPを示し、(●)はウシCRSPを示し、(▲)はイヌCRSPをそれぞれ示す。

【図17】図17は、CRSP遺伝子の塩基配列を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図18】図18は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の前半部分(1~3840塩基)を示す。

10

20

30

40

50

【図19】図19は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の後半部分(3841~7673塩基)を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP-2遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図20】図20は、CRSP-2のcDNA塩基配列を示す。図20において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図21】図21は、CRSP-3のcDNA塩基配列を示す。図21において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図22】図22は、CT-2のcDNA塩基配列を示す。図22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。

【図23】図23は、各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行った図を示す。

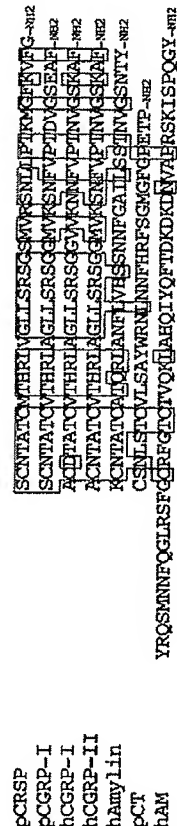
本発明のペプチドのCRSP(pCRSP)、CRSP-2(pCRSP-2)、CRSP-3(pCRSP-3)、CT-2(pCT-2)のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pCGRP)、ブタカルシトニン(pCT)、及びブタアドレノメデュリン(pAM)のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図24】図24は、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRPの遺伝子発現量をRT-PCRにより高感度定量した結果を示す。図の縦軸に各種遺伝子を、横軸に遺伝子発現量を測定したブタの組織を示す。トータルRNA量の補正のためにGAPDH(グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素)の発現量についても測定した。

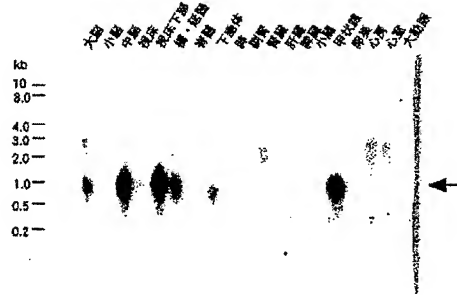
【図1】



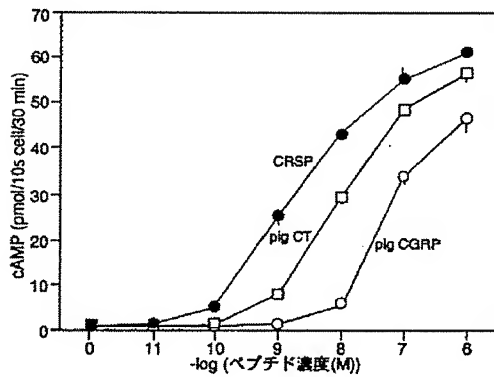
【図2】



【図 3】

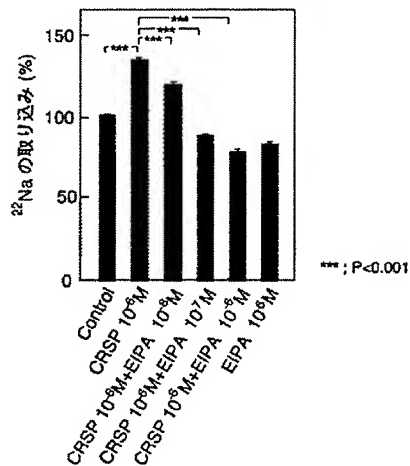


【図 4】



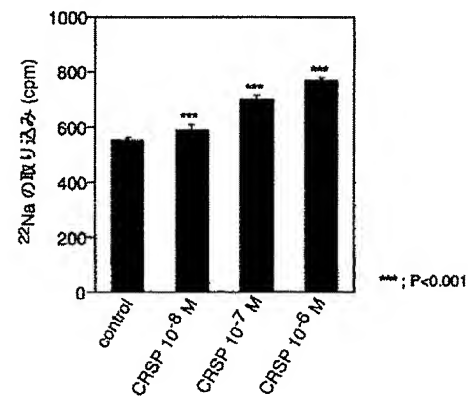
【図 6】

EIPA(アミロライド誘導体)によるNa取り込み上昇の阻害



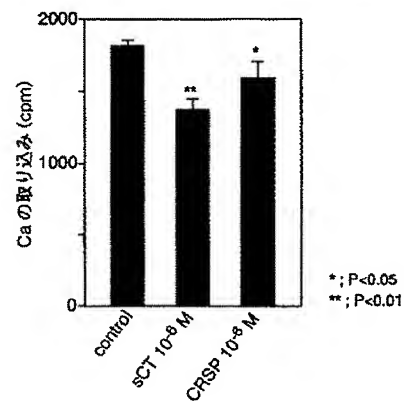
【図 5】

CRSP 刺激による²²Naの取り込みの変化

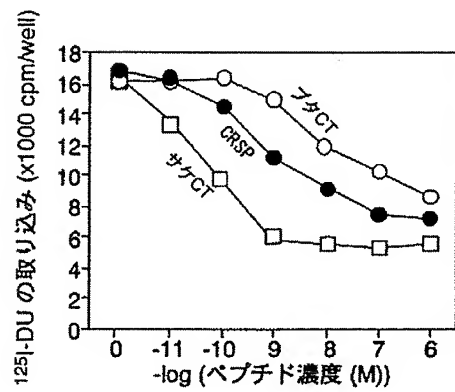


【図 7】

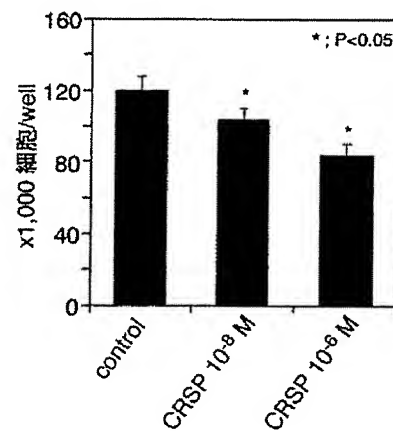
CRSP 刺激による⁴⁵Caの取り込みの変化



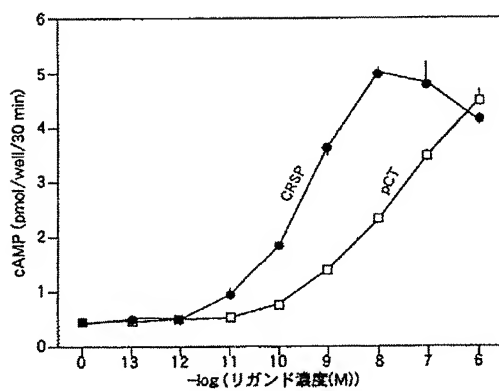
【図 8】



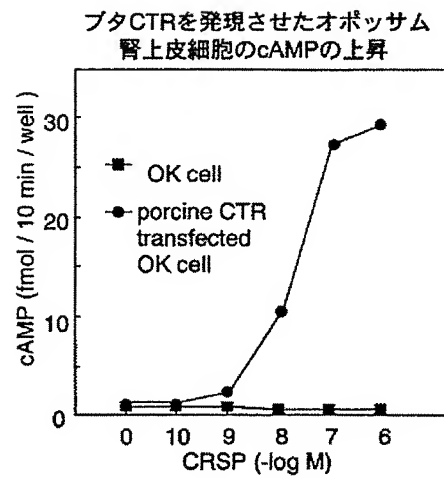
【図 9】



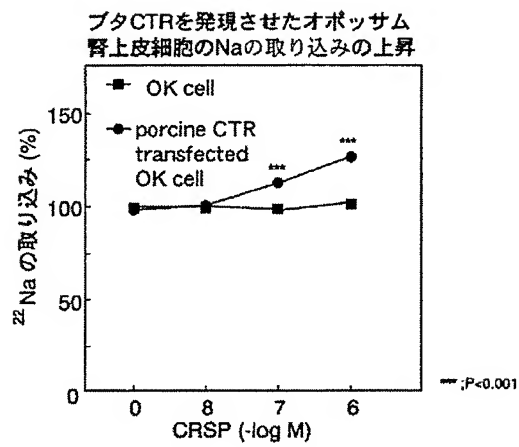
【図 10】



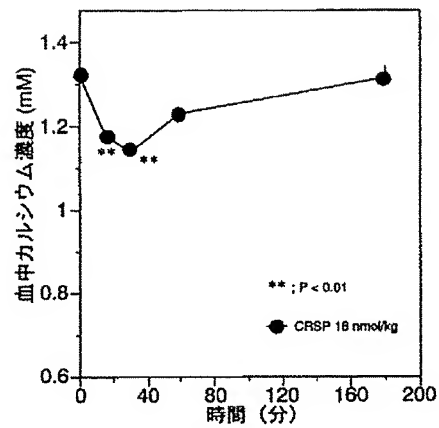
【図 11】



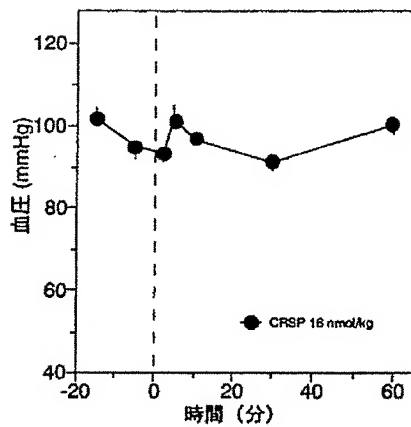
【図 1 2】



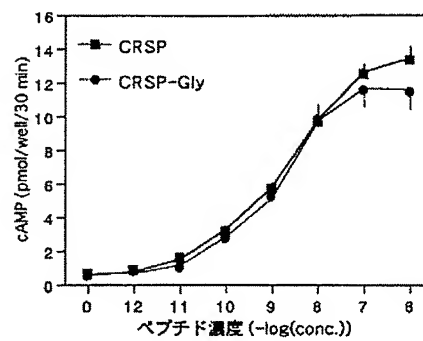
【図 1 3】



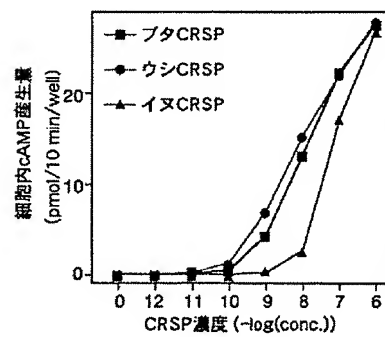
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【図 2 1】

GODCAGCTTACGCTTCGCTTCTTCCGCAAGTCCCACTCACTGCGCAGCAGCGGGTTGTTC	-52
TTCCTCCACTTGGGCTCCAGCTACCTACTGGTCTCTGCATCCAGAGGGACACATGGGCTCT	3
	<i>M G F</i>
TGGAAAGTCCCCGCTTCTGTATCTCCAGCATCTCGTCTCTGTACCAAGAGAAAGCTC	69
W K F F L L L S I L V L Q A G N L	123
CATCGCCGCCCACTCAGGAATGGCTTTGGCAAGCAGCTTGATCTGCCCACTCACTGAGAA	239
H A A P F R M A L G S G S F D S A T L T E	43
GAGGAATGTCTCTCTACTGCTTGCATAGTGAAGCAATATGTGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E H M S L L L V A M K V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGGACAGGAGCTTACAGCTCAACCACCCGAGAGATCTCGCAACACT	249
V L E Q E T E D F S G T T T Q E R S <u>C N T</u>	83
GGCTCTGTGTGACCCCAAGATGAGTGTGCTGAGCAGATCTGGCAGCTGGTTTAAG	309
A T C T V T H K M A G G W L E R S G S V V T	103
AACCAACTTCATGGCCATCAACATGGGCTCCAAAGCTGTGGGCGGGCGCCGACAGAGCT	369
<u>N N F M F P T N M G S K V L</u> <u>GGG</u> R R R R Q P	123
CAGCGCTGAGCTGTGAATAGCTTAAAGAGAGTGTGAATCTCAAGTTCGTTTCACTGCAG	429
Q A *	125
AGTTCCTTTTCCTCGCAATTTAAAGAAACCAATTTGAAANAATAGCATGAGACACACATA	489
TATGATCACTCTCTCTGTCTGAATCAACAACCTTTTCTCTGTAACAACCACTTAACCTTAATGA	549
TAATGAATTAATCACTGAGCTGACTGGA	574

【図 22】

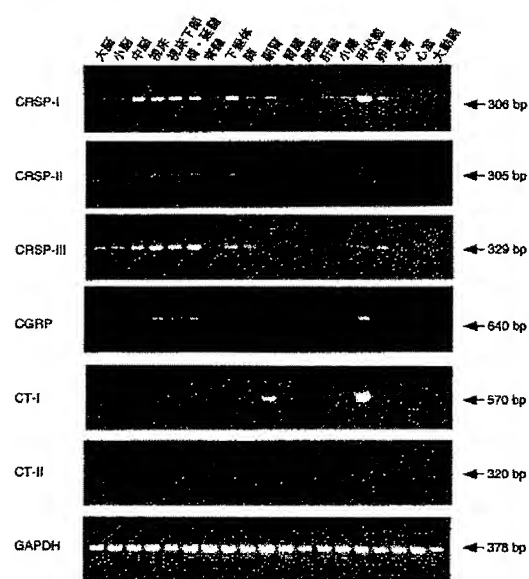
[illegible]

【图 23】

PCRSP-2 NH
PCRSP-3 NH
PCRSP NH
PCRGP NH
PAN

PCPCT-2 NH
PCT-2 NH

【圖 24】



 フロントページの続き
(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 K 37/02	

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 CA21 CA28 DB31 MA28 MA44
 MA52 MA60 MA63 MA66 ZA082 ZA362 ZA422 ZA702 ZA832 ZA972
 ZB262
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA19 CA45 EA21 EA23 EA26 EA27 EA28
 FA71 GA20